



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

TESIS

**PRESENCIA DE *Escherichia coli* ENTEROPATOGENICA EN
CARNE MOLIDA OBTENIDA EN PUNTO DE VENTA DEL
MUNICIPIO DE HUASCA DE OCAMPO, HIDALGO**

**Para obtener el título de
Licenciada en Biología**

PRESENTA

Ana Paola Cordero López

Director

Dr. Víctor Manuel Martínez Juárez

Codirector

Dr. Vicente Vega Sánchez

Comité tutorial

Dr. Juan Carlos Gaytán Oyarzun

Dra. Sylvia Martínez Hernández

Mineral de la Reforma, Hidalgo, noviembre 2023



Mineral de la Reforma, Hgo., a 1 de noviembre de 2023

Número de control: ICBI-D/1552/2023

Asunto: Autorización de impresión.

**MTRA. OJUKY DEL ROCÍO ISLAS MALDONADO
 DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH**

Con fundamento en lo dispuesto en el Título Tercero, Capítulo I, Artículo 18 Fracción IV; Título Quinto, Capítulo II, Capítulo V, Artículo 51 Fracción IX del Estatuto General de nuestra Institución, por este medio le comunico que el Jurado asignado a la Pasante de la Licenciatura en Biología **Ana Paola Cordero López**, quien presenta el trabajo de titulación **“Presencia de *Escherichia coli* enteropatógena en carne molida obtenida en punto de venta del municipio de Huasca de Ocampo, Hidalgo”**, después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación, firman de conformidad los integrantes del Jurado:

Presidente Dr. Juan Carlos Gaytán Oyarzun

Secretario: Dr. Vicente Vega Sánchez

Vocal: Dr. Víctor Manuel Martínez Juárez

Suplente: Dra. Sylvia Martínez Hernández

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
 “Amor, Orden y Progreso”

Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval
 Director del ICBI



OAAS/YCC

Ciudad del Conocimiento
 Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Colonia
 Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo,
 México. C.P. 42184
 Teléfono: 771 71 720 00 ext. 2231 Fax 2109
 direccion_icbi@uaeh.edu.mx



TÍTULO

“Presencia de *Escherichia coli* enteropatógena en carne molida obtenida en punto de venta del municipio de Huasca de Ocampo, Hidalgo”

*A mi madre, Vianey López Oliver por ser la
inspiración de una gran mujer y el pilar de mi actuar.*

*A mi hermana, Yuridia Vianey Cordero López,
por ser el ejemplo de superación, por ser la hermana
mayor que cuida y protege a sus hermanos.*

*A mi tía, María de Lourdes Vicario Cova, por los
consejos y el apoyo incondicional.*

*Al amor de mis días, Víctor Johan Osvaldo
Acosta Pérez, por ser mi verbo "to be", por el amor y
los momentos mágicos que vivimos juntos.*

Agradecimientos

Al Dr. Víctor Manuel Martínez Juárez por aceptarme bajo su dirección e integrarme a su laboratorio, por brindarme el apoyo y la guía para realizar este proyecto de investigación.

Al Dr. Vicente Vega Sánchez, por secundar la dirección de este proyecto, por su paciencia y orientación tanto en lo experimental como en la teoría.

A la Dra. Nydia Edith Reyes Rodríguez, por colaborar en este proyecto, por brindarme asesoría en los experimentos, por la confianza que depositó en mí.

Al Dr. Juan Carlos Gaytán Oyarzun, por aceptarme como tutorada, por guiarme durante el transcurso de la licenciatura y estar pendiente de mí, por sus consejos y orientación durante la realización de este proyecto.

A la Dra. Sylvia Martínez Hernández, por aceptar ser miembro del jurado, por su enseñanza que despertó en mí el interés por la microbiología.

Abreviaturas

ABC	ATP-cassettes de unión
ACP	Análisis de componentes principales
AM	Ampicilina
AK	Amikacina
CB	Carbenicilina
CF	Cefalotina
CFX	Cefotaxima
CL	Cloranfenicol
CPF	Ciprofloxacino
CTX-M	Cefotaximasas
DAEC	<i>E. coli</i> de adherencia difusa
DEC	<i>E. coli</i> diarreogénicas
DHFR	Ácido dihidrofolato reductasa
DHPS	Ácido dihidropterico sintasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativos
EDA	Enfermedad diarreica aguda
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágicas
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasivas
EMB	Agar Eosina Azul de Metileno
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogénicas
ERIC	Secuencias consenso intergénicas repetitivas de enterobacterias
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénicas
ETAs	Enfermedades Transmitidas por Alimentos
ExPEC	<i>E. coli</i> extraintestinales

GE	Gentamicina
MATE	Familia de extrusión de compuestos tóxicos y multidrogas
Mc	Agar MacConkey
McS	Agar MacConkey con sorbitol
MDR	Multirresistentes
MFS	Superfamilia de facilitadores principales
MGE	Elementos genéticos móviles
MITEs	Elementos transponibles invertidos en miniatura
MLST	Tipificación Multilocus de Secuencias
MUG	4-metilumbeliferil- β -d-glucuronidasa
NET	Netilmicina
NF	Nitrofurantoína
NOF	Norfloxacino
ONPG	o-nitrofenil- β -d-galactopiranosido
OMS	Organización Mundial de la Salud
PABA	Ácido paraaminobenzoico
PACE	Sistemas de expulsión de proteobacterias
PBP	Proteína de unión a penicilina
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDR	Panresistentes
PFGE	Electroforesis en Gel de Campo Pulsado
PIB	Producto Interno Bruto
PTT	Púrpura trombocitopénica trombótica
RFLP	Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica
RND	Familia de división celular de nodulación de resistencia
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
SAM	S-adenosil-L-metionin
SHV	Variable de sulfhidrilo
SLST	Tipificación de Secuencias de un Locus

SMR	Familia pequeña de resistencia a múltiples fármacos
STEC	<i>E. coli</i> productora de la toxina shiga
STX	Sulfametoxazol/trimetoprim
SUH	Síndrome urémico hemolítico
TE (buffer)	Solución tampón Tris-EDTA
TEM	Temoniera
UV	Ultravioleta
WGS	Secuenciación del Genoma Completo
XDR	Resistencia extendida

Tablas

Tabla 1. Número de operones ribosómicos (*rrn*) en algunas especies de bacterias.

Tabla 2. Mecanismos de acción de los antibióticos.

Tabla 3. Mecanismos de resistencia.

Tabla 4. Pruebas bioquímicas de los 20 aislados presuntivos de *E. coli*.

Tabla 5. Identificación molecular mediante Blast de la secuencia del gen 16S rRNA de los aislados de *E. coli*.

Tabla 6. Presencia de genes de virulencia e integrón clase 1 en los aislados de *E. coli*.

Tabla 7. Identificación molecular de plásmidos mediante Blast de la región variable del integrón clase 1 en los aislados de *E. coli*.

Tabla 8. Componentes del ACP con su eigenvalue y el % de la varianza.

Tabla 9. Pruebas bioquímicas de las especies aisladas en el presente estudio.

Tabla 10. Comparación de las familias de antibióticos evaluados en diferentes estudios.

Figuras

Figura 1. Ubicación de los puntos de muestreo en el Municipio de Huasca de Ocampo, Hidalgo.

Figura 2. Aislado de *E. coli* en agar EMB, se aprecia el característico brillo verde metálico.

Figura 3. Frecuencia de resistencia y sensibilidad a los antibióticos. S: sensible, I: intermedio, R: resistente; AK: amikacina, AM: ampicilina, CB: carbenicilina, CF: cefalotina, CFX: cefotaxima, CPF: ciprofloxacino, CL: cloranfenicol, GE: gentamicina, NET: netilmicina, NF: nitrofurantoína, NOF: norfloxacino y STX: sulfametoxazol/trimetoprim.

Figura 4. Porcentaje de resistencia y sensibilidad de los aislados a las familias de antibióticos. R: resistente, I: intermedio, S: sensible.

Figura 5. Dendrograma resultado del análisis del patrón de bandas de ERIC-PCR que evidencia la diversidad genética de las 13 cepas de *E. coli* aisladas.

Figura 6. Revelado de la electroforesis en gel de agarosa (1.5%). A) Genes de virulencia *hlyA*, *stx1* y *stx2*, donde: M marcador de peso molecular, pozos 1-11 muestras de *E. coli* positivas a los genes *stx1* y *stx2*, pozos 12-15 controles - y +. B) Gen de virulencia *eaeA*, donde: M marcador de peso molecular, pozos 1-6 muestras de *E. coli*, pozos 8-11 controles - y +.

Figura 7. Revelado de la electroforesis en gel de agarosa (1.5%). M marcador de peso molecular, pozos 1-6 aislados de *E. coli* positivos para el gen de la integrasa. Pozos 7 control - y pozo 8 control +.

Figura 8. Revelado de la electroforesis en gel de agarosa (1.5%). M marcador de peso molecular, pozos 1-6 amplicón de la región variable del integrón clase 1.

Figura 9. Agrupamiento jerárquico por clustering clásico de los aislados de *E. coli* basado en la resistencia o sensibilidad frente a los antibióticos y la presencia o ausencia de los factores de virulencia. Número en los nodos: porcentaje de réplicas donde cada nodo resulta compatible en un bootstrapping de 1000 réplicas.

Figura 10. Agrupamiento bidireccional por emparejamiento de grupos. Se muestra el agrupamiento de los aislados de *E. coli* y el agrupamiento de las variables descriptivas (antibióticos y genes de virulencia). R: resistente, I: intermedio, S: sensible, P: presencia, A: ausencia.

Figura 11. ACP, scatter plot del ordenamiento de los aislados de *E. coli* respecto a las variables descriptivas (antibióticos y genes de virulencia). Las elipses representan un intervalo de confianza del 95%.

Índice

Abstract	1
Resumen	2
I. Introducción	3
II. Antecedentes	5
Producción de carne	5
<i>Escherichia coli</i>	6
Tipificación bacteriana	8
Pruebas bioquímicas	9
Pruebas moleculares	10
Secuencias Consenso Intergénicas Repetitivas de Enterobacterias	11
Identificación molecular bacteriana	12
Reacción en Cadena de la Polimerasa	12
Electroforesis	12
Secuencias utilizadas para la identificación	13
Mecanismos de acción de los antibióticos	16
Inhibición de la síntesis de la pared celular	17
Destrucción de la membrana celular	17
Inhibición de síntesis de ácidos nucleicos	18
Inhibición de síntesis de proteínas	19
Bloqueo de las vías metabólicas	19
Resistencia antimicrobiana	20
Mecanismos de resistencia	20
Disminución de la concentración del fármaco	21

	Modificaciones en el sitio diana del antibiótico	23
	Modificación del antimicrobiano	25
	Integrones.....	26
III.	Hipótesis	28
IV.	Justificación	29
V.	Objetivos	30
	Objetivo general.....	30
	Objetivos específicos	30
VI.	Materiales y métodos	31
	Sitio de muestreo.....	31
	Toma de muestra.....	32
	Aislamiento	32
	Identificación bacteriana.....	33
	Tinción	33
	Bioquímica.....	33
	Extracción de DNA.....	34
	Amplificación gen 16S.....	35
	Sensibilidad antimicrobiana.....	36
	Factores de virulencia.....	37
	Integrasa	38
	Secuenciación.....	39
	ERIC	39
	Análisis de componentes principales (ACP).....	40
VII.	Resultados	42
	Aislamiento e identificación bioquímica	42

	Sensibilidad antimicrobiana	44
	Secuenciación del gen 16S rRNA	46
	ERIC	48
	Factores de virulencia.....	49
	Integrón	50
	Análisis de componentes principales	53
VIII.	Discusión	57
IX.	Conclusiones	72
X.	Anexos	73
XI.	Bibliografía	76

Abstract

Escherichia coli is a Gram-negative, facultative anaerobic bacillus, it belongs to the *Enterobacteriaceae* family, it is part of the microbiota of mammals such as ruminants and humans, where they are commensal and harmless, however, some pathogenic strains have emerged, causing diarrhea, called diarrheagenic *E. coli* and those that exert their pathogenicity extra-intestinally. These pathotypes are of interest in public health because they are causal agents of Foodborne Diseases, where the foods most frequently involved are those of animal origin, mainly ground meat. The objective of this study was to determine the presence and identification of *E. coli* in ground meat sampled at a point of sale in the municipality of Huasca de Ocampo, Hidalgo, for which, suspicious colonies were isolated on agar under laboratory conditions. MacConkey and MacConkey with sorbitol, biochemical tests for indole, methyl red, Voges Proskauer, citrate and TSI were performed. Sensitivity and resistance to 12 antibiotics were determined implementing the Kirby-Bauer method. From the DNA extraction, the 16S rRNA gene was amplified for sequencing; The ERIC-PCR technique was performed to determine the genetic diversity of the isolates; The presence of the class 1 integron was detected and its variable region was amplified for sequencing; 4 virulence genes were identified, *hlyA*, *eaeA*, *stx1* and *stx2*. A total of 20 strains were isolated, 100% of them presented multi-resistance, in antibiotics such as ampicillin, carbenicillin, cephalothin and cefotaxime the isolates presented 100% resistance, for norfloxacin 85% of strains were sensitive. As a result of the analysis of the 16S rRNA sequences, 13 strains of *E. coli* and 7 that do not belong to *E. coli* were identified, indicating a prevalence of 65% of *E. coli* in the ground beef samples. The 13 *E. coli* isolates are genetically different strains; with the analysis of the pattern obtained from the ERIC-PCR, 8 genotypes were observed, indicating 64% genetic diversity. Of the 13 strains, 11 belong to the EHEC pathotype, as they present the virulence genes *stx1*, *stx2* and *eaeA*. The class 1 integron was detected in 6 isolates, with the presence of plasmids such as: psh13D178-2, pLSB54-mcr-1 and pKLP00221_2.

Resumen

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, pertenece a la familia de las *Enterobacteriaceae*, forma parte de la microbiota de mamíferos como los rumiantes y humanos, donde son comensales, sin embargo, han surgido algunas cepas patógenas, las causales de diarreas, denominadas *E. coli* diarreogénicas y las que ejercen su patogenicidad de forma extra-intestinal. Estos patotipos son de interés en salud pública por ser agentes causales de ETAs, donde los alimentos involucrados con mayor frecuencia son los de origen animal, principalmente la carne molida. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia e identificación de *E. coli* en carne molida muestreadas en punto de venta en el municipio de Huasca de Ocampo, Hidalgo, para lo cual, se cultivaron en condiciones de laboratorio y se aislaron colonias sospechosas en agar MacConkey y MacConkey con sorbitol, se realizaron las pruebas bioquímicas de indol, rojo de metilo, Voges Proskauer, citrato y TSI. Se determinó la sensibilidad y resistencia a 12 antibióticos implementando el método de Kirby-Bauer. A partir de la extracción de DNA, se amplificó el gen 16S rRNA para secuenciar; se realizó la técnica ERIC-PCR para determinar la diversidad genética de los aislamientos; se detectó la presencia del integrón clase 1 y se amplificó la región variable del mismo para secuenciar; se identificaron 4 genes de virulencia, *hlyA*, *eaeA*, *stx1* y *stx2*. Se aislaron 20 cepas en total, el 100% de ellas presentaron multirresistencia, en antibióticos como ampicilina, carbenicilina, cefalotina y cefotaxima los aislados presentaron 100% de resistencia, para norfloxacino el 85% de cepas fueron sensibles. Resultado del análisis de las secuencias del 16S rRNA, se identificaron 13 cepas de *E. coli* y 7 que no pertenecen a *E. coli*, lo que indica una prevalencia del 65% de *E. coli* en las muestras de carne molida. Los 13 aislados de *E. coli* son cepas genéticamente diferentes, con el análisis del patrón obtenido del ERIC-PCR se observaron 8 genotipos, lo que indica una diversidad genética del 64%. De las 13 cepas 11 pertenecen al patotipo de las EHEC, por presentar los genes de virulencia *stx1*, *stx2* y *eaeA*. El integrón clase 1 se detectó en 6 aislados, con la presencia de plásmidos como: psh13D178-2, pLSB54-mcr-1 y pKLP00221_2.

I. Introducción

La inocuidad de los alimentos refiere a la garantía de que éstos no representan ningún tipo de daño al consumidor al ser preparados e ingeridos de acuerdo con el uso al que se destinan (Fragoso-Castilla *et al.*, 2020; OIRSA, 2018). Sin embargo, por su misma naturaleza, los alimentos son susceptibles de contaminación, ésta puede ser de tres tipos: física (fragmentos de vidrio, metal, madera, etc.), química (compuestos inorgánicos tóxicos, antimicrobianos, promotores del crecimiento, aditivos alimentarios, lubricantes, tintas, toxinas, desinfectantes, metales pesados y pesticidas) y biótica (bacterias, parásitos, hongos, virus y priones) (Abdolshahi & Shokrollahi, 2020; DOF, 1995; DOF, 2010; Fernández *et al.*, 2021). La contaminación biológica de los alimentos se puede dar por dos vías, la contaminación primaria y la cruzada; la primera refiere a la contaminación que se da durante la producción primaria (cosecha, faenado, ordeña, pesca), los alimentos pueden albergar por sí mismos microorganismos patógenos, toxigénicos y saprofitos; y la contaminación cruzada o indirecta, que se refiere a la contaminación de un alimento inocuo por estar en contacto con otros alimentos, utensilios o superficies contaminadas (FAO/OPS, 2017; Radilla *et al.*, 2019).

La carne también sufre contaminación biológica, que se puede dar en cualquier etapa del procesamiento primario y manipulación de la misma (faenado, matanza, evisceración, conservación, transporte, distribución y comercialización) (Cabrera-Maldonado *et al.*, 2013; Cardona-López *et al.*, 2020; CCMPH, 2005; Pedraza & Cordoba, 2020). De manera muy específica, la carne molida de res ha sido el vehículo más frecuente en los brotes epidémicos por presentar mayor riesgo de contaminación a causa de la mala higiene del equipo para triturar, aunado al hecho de que, en este proceso, las fascias protectoras y miofibrillas presentes en la carne se destruyen y los patógenos que se encuentran en la superficie de la misma, logran penetrar el tejido muscular (Carrillo *et al.*, 2007; Greig *et al.*, 2005; Jure *et al.*, 2010; Méndez *et al.*, 2013). Dentro de las principales bacterias que se asocian a una contaminación destacan géneros como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp.,

Yersinia spp., y especies como *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* (Cabrera-Maldonado *et al.*, 2013; CCMPH, 2005; Hajjan *et al.*, 2011; Soto-Varela *et al.*, 2016).

La contaminación de los alimentos es un problema en salud pública por causar Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) que son aquellas enfermedades originadas por la ingesta de agua y/o alimentos contaminados con agentes biológicos o sustancias tóxicas en cantidades que afectan la salud del consumidor (Brusa, 2015; Sharif *et al.*, 2018). Entre las fuentes más comunes de ETAs se incluyen productos de origen animal crudos (específicamente carne, huevos, mariscos y leche sin pasteurizar), frutas y hortalizas crudas, además de un manejo y almacenamiento insalubre de los alimentos preparados (CDC, 2022a). Actualmente se conocen más de 250 enfermedades que se transmiten por alimentos contaminados, colonizando el tracto gastrointestinal principalmente, provocando desde náuseas, vómito, diarrea, dolor abdominal, fiebre, hasta presentar complicaciones como sepsis, meningitis, abortos, síndrome de Reiter (es una enfermedad sistémica, caracterizada por artritis aséptica) síndrome de Guillain Barré (trastorno poco frecuente en el cual el sistema inmunitario del organismo ataca los nervios), insuficiencia renal y hepática, trastornos cerebrales y neurológicos, artritis reactiva e incluso la muerte (Fernández *et al.*, 2021; Soto-Varela *et al.*, 2016). La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que la carga mundial de ETAs es equiparable con las principales enfermedades infecciosas: VIH/sida, paludismo y tuberculosis (Zúñiga & Caro, 2017), anualmente 600 millones de personas se enferman por ETAs, causando la muerte de 420,000 individuos, de los cuales 125,000 son niños menores de 5 años (FERG, 2015; Fernández *et al.*, 2021). Así mismo, está descrito que anualmente 550 millones de personas enferman por diarreas y 230,000 fallecen. De esta cifra, 220 millones son niños y las defunciones alcanzan la cifra de 96,000 (OMS, 2015). El objetivo de este estudio fue determinar y caracterizar la presencia de enteropatótipos *E. coli* en carne de origen bovino mediante técnicas bioquímicas y moleculares para ampliar la información del impacto en salud pública.

II. Antecedentes

Producción de carne

La actividad pecuaria comprende la cría, tratamiento y reproducción de animales domésticos para consumo humano, obteniendo carne como principal producto (SIAP, 2018). Esta actividad es de relevancia económica, ya que, se estima que más de 1 billón de personas alrededor del mundo dependen de esta actividad y en América Latina contribuye con el 46% del PIB (Producto Interno Bruto) agropecuario, porcentaje que crece a una tasa anual de 3.7% (FAO, 2023). De esta actividad se obtiene el 34% de la proteína que se consume a nivel mundial, por lo que también es importante como fuente de proteína para la dieta humana (Steinfeld *et al.*, 2009).

En 2020 la producción mundial de carne alcanzó la cifra de 337 millones de toneladas, principalmente de pollo (35%), cerdo (33%) y res (20%). Los países que representan la mayor producción son China, Estados Unidos y Brasil (FAO, 2022). México se ubica como el noveno productor de proteína de origen vacuno (SIAP, 2022a).

En México se explotan alrededor de 30 razas bovinas (Angus, Hereford, Charolais, Nelore, Pardo Suizo Europeo y Angus, etc.) para la obtención de productos cárnicos (SADER, 2015). En 2021 México se colocó como el 6^{to} productor de carne en canal de origen bovino a nivel mundial con 2,130,591 de toneladas, con un valor en la producción de 151,763 millones de pesos. Los estados con mayor producción del país son Veracruz (274,420 toneladas), Jalisco (249,921 toneladas), San Luís Potosí (129,163 toneladas), Durango (115,004 toneladas), Baja California (111,882 toneladas), Sinaloa (109,671 toneladas), Chiapas (109,306 toneladas), Michoacán (99,620 toneladas), Chihuahua (89,199 toneladas) y Sonora (76,180 toneladas) (SIAP, 2022b).

El sector pecuario también es eslabón en la economía del estado de Hidalgo, en el 2021 la producción fue de 31,275.926 toneladas, con valor en producción de 2,230 millones de pesos. Los 10 municipios con mayor producción son: San Felipe Orizatlán, Huejutla de Reyes, Tepeji del Río, Tula de Allende, Ixmiquilpan, San Bartolo Tutotepec, Huichapan, Actopan, Acatlán y Nopal de Villagrán. Huasca de Ocampo está ubicado en la posición 35 con un total de 343 toneladas de carne de canal bovino, lo que permite identificar la importancia de esta actividad económica (SIAP, 2022b).

Escherichia coli

Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, con forma de bacilo Gram negativo, que mide entre 1.1 – 1.5 y 2 – 6 μm , presenta flagelos peritricos que le confieren movilidad, puede ser aerobio y anaerobio facultativo, es decir, disponen de metabolismo respiratorio y fermentativo (Gomes *et al.*, 2016; Rípodas-Navarro *et al.*, 2017). Comúnmente habita el tracto gastrointestinal de mamíferos, como los rumiantes y humanos, donde usualmente son comensales e inofensivas, constituyen alrededor del 1% de la microbiota del intestino (Brusa, 2015; FAO, 2011). Sin embargo, también forman parte del microbioma de aves, reptiles y peces, aunque con menor frecuencia (Blount, 2015).

En la actualidad han surgido varias cepas patógenas de *E. coli*, que se caracterizan por su capacidad de provocar varias enfermedades, resultado de la expresión génica, que les confiere la posibilidad de producir toxinas y la capacidad de adhesión e invasión de células huéspedes, además de la interferencia con el metabolismo celular y destrucción de tejidos (FAO, 2011; Gordon, 2013). Estas cepas patógenas se clasifican en dos grandes grupos, las *E. coli* diarreogénicas (DEC por sus siglas en inglés “diarrheagenic *E. coli*”) asociadas a infecciones gastrointestinales y las *E. coli* extraintestinales, cuya patogenicidad la ejercen fuera del tracto gastrointestinal (ExPEC por sus siglas en inglés “extraintestinal pathogenic *E. coli*”) (Allocati *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2020).

Dentro de las *E. coli* diarreogénicas se encuentran seis patotipos, clasificados con base en la enfermedad que provocan y factores de virulencia característicos de cada cepa (Blount, 2015; Brusa, 2015; Canata *et al.*, 2016; Castro, 2014):

- A) *E. coli* enterotoxigénicas (ETEC por sus siglas en inglés “enterotoxigenic *E. coli*”) caracterizada por los genes *elt* y *est*.
- B) *E. coli* enteropatogénicas (EPEC por sus siglas en inglés “enteropathogenic *E. coli*”) que presentan el gen *eaeA*.
- C) *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC por sus siglas en inglés “enterohemorrhagic *E. coli*”) llegan a compartir el gen *eaeA* y se caracterizan por la presencia del gen *stx*, productor de toxina shiga (también conocidas como STEC por sus siglas en inglés “shiga toxin-producing *E. coli*”).
- D) *E. coli* enteroagregativos (EAEC por sus siglas en inglés “enteroaggregative *E. coli*”) con el gen *aggR*.
- E) *E. coli* enteroinvasivas (EIEC por sus siglas en inglés “enteroinvasive *E. coli*”) con presencia del gen *ipaH*.
- F) *E. coli* de adherencia difusa (DAEC por sus siglas en inglés “diffusely adhering *E. coli*”).

Es importante mencionar que, aunque las cepas estén clasificadas en estos patotipos, pueden llegar a intercambiar los factores de virulencia (Chattopadhyay & Sokurenko, 2013; Gomes *et al.*, 2016). En el hombre, las cepas de ETEC y EPEC colonizan el intestino delgado, mientras que las EIEC y EHEC colonizan el intestino grueso y la cepa EAEC ambos. Por otro lado, para las cepas DAEC, no se ha definido la localización exacta para la colonización intestinal (Williams *et al.*, 2011).

Las DEC son importantes agentes etiológicos causales de ETAs, a través de la historia, se han reportado varios brotes epidémicos provocados por cepas de *E. coli*, en 1993 en Japón se reportó un brote en escuelas de nivel básico por *E. coli* H10, otro ejemplo es el reportado por *E. coli* O157:H7 que causó un brote de colitis hemorrágica en Estados Unidos en 1982, otro caso fue el de *E. coli* O92:H33 que provocó un brote de diarreas en Italia, 2006. En Alemania se reportó un brote por *E. coli* O104:H4 que causó la muerte de 39 personas en 2011; en México en 2002 se reportó un brote por ETEC en Chalco por el desbordamiento de un canal de aguas residuales, estos son solo algunos ejemplos de los brotes epidémicos causados por *E. coli* diarreogénicas (Cortés-Ortiz *et al.*, 2002; FAO/WHO, 2011; Vila & Zboromyrska, 2012).

Tipificación bacteriana

Cuando se trabaja en microbiología, en especial con bacterias, es importante identificar de forma precisa al agente etiológico con el que se está trabajando, por ello, se han implementado diferentes técnicas para identificar y caracterizar al agente de estudio; estas técnicas se pueden clasificar en convencionales y moleculares (Bou *et al.*, 2011; Castro-Escarpulli *et al.*, 2015; Fernández *et al.*, 2010).

Las técnicas convencionales se basan en las características morfológicas (macroscópicas o microscópicas), desarrollo y metabolismo de las bacterias. Dentro de estas técnicas se incluye las tinciones (siendo la tinción de Gram la más utilizada), el cultivo (que permite el aislamiento del microorganismo implicado), las pruebas bioquímicas, antibiogramas y serotipificación (Almasian-Tehrani *et al.*, 2021; Bou *et al.*, 2011; Fernández *et al.*, 2010).

Las técnicas moleculares se basan en la composición de los genes bacterianos, se pueden detectar ácidos nucleicos del microorganismo de estudio, además de ácidos grasos y proteínas (Castro-Escarpulli *et al.*, 2015).

Pruebas bioquímicas

Son utilizadas para determinar las características metabólicas de las bacterias. Algunas de estas pruebas son de lectura rápida, ya que evalúan la presencia de una enzima como la catalasa y oxidasa. Sin embargo, para la mayoría de las pruebas, es necesario el crecimiento del organismo, por lo que se requiere de una incubación de entre 18 – 48 horas (Bou *et al.*, 2011; Castro-Escarpulli *et al.*, 2015; Fernández *et al.*, 2010).

Existen diversas pruebas bioquímicas implementadas en la identificación de las *Enterobacteriaceae*, las más comunes son la de indol, rojo de metilo, Voges-Prokauer y citrato, éstas son usualmente conocidas como las pruebas IMViC (De la Maza *et al.*, 2004) y la prueba TSI. Otras pruebas bioquímicas aplicadas en la identificación de enterobacterias son la prueba de la ureasa, fenilalanina, triptófano, lisina, ornitina, arginina, o-nitrofenil- β -d-galactopiranósido (ONPG), 4-metilumbeliferil- β -d-glucuronidasa (MUG) y la hidrólisis de gelatina, entre otras (Brenner & Farmer III, 2005).

- A) Indol: con esta prueba se detecta la presencia de indol en el cultivo bacteriano. Dicha liberación se produce por la degradación del triptófano mediante la enzima triptofanasa (MacWilliams, 2009b).
- B) Rojo de metilo: mediante esta prueba se determina la capacidad bacteriana de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa por la vía de fermentación ácido mixta. Usualmente se utiliza para identificar a especies de bacilos Gram negativos (Mcdevitt, 2009).
- C) Voges-Prokauer: esta prueba permite observar si las bacterias son capaces de fermentar glucosa por la vía butanodiólica, si esto pasa, se forma acetoína que reacciona con el α -naftol y forma un complejo rojizo.

También se utiliza para la identificación de bacilos Gram negativos (Mcdevitt, 2009).

D) Citrato: con esta prueba se logra determinar la capacidad de las bacterias de utilizar el citrato como única fuente de carbono y compuestos amoniacales como única fuente de nitrógeno en su metabolismo, provocando la alcalinización del medio (MacWilliams, 2009a).

E) TSI: mediante esta prueba se pueden determinar la capacidad bacteriana de metabolizar tres carbohidratos (glucosa, lactosa y sacarosa). También la producción de gases (CO_2 y H_2) como productos finales tras metabolizar estos carbohidratos. Además, permite visualizar la producción de ácido sulfhídrico (H_2S^+) (Lehman, 2005).

Pruebas moleculares

Las técnicas moleculares sirven como técnicas complementarias a las convencionales. Utilizan a genes presentes en las bacterias o su ausencia para la identificación del microorganismo de estudio (Culbreath *et al.*, 2016).

Las técnicas moleculares utilizadas en la tipificación bacteriana se pueden clasificar en 4 clases (Almasian-Tehrani *et al.*, 2021):

A) Métodos basados en bandas, en el que la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés “polymerase chain reaction”) juega un papel importante, con esta técnica se obtiene un gran número de copias de fragmentos específicos del material genético de manera rápida y económica, algunas técnicas son la REP-PCR, RAPD-PCR y ERIC-PCR.

B) Métodos basados en hibridación, donde se utilizan sondas de nucleótidos, aquí se ubican técnicas como hibridación DNA-DNA.

- C) Métodos basados en la secuenciación que estudian el polimorfismo de las secuencias de ácido desoxirribonucleico (DNA por sus siglas en inglés “deoxyribonucleic acid”) con técnicas como la Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST por sus siglas en inglés “multilocus sequence typing”), Tipificación de Secuencias de un Locus (SLST por sus siglas en inglés “single-locus sequence typing”) y Secuenciación del Genoma Completo (WGS por sus siglas en inglés “whole-genome sequencing”).
- D) Métodos basados en la restricción enzimática, como Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE por sus siglas en inglés “pulsed-field gel electrophoresis”) y Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLP por sus siglas en inglés “restriction fragment length polymorphism”).

Secuencias Consenso Intergénicas Repetitivas de Enterobacterias

Las Secuencias Consenso Intergénicas Repetitivas de Enterobacterias (ERIC por sus siglas en inglés “Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus”) Son secuencias cortas repetidas y esparcidas dentro de las enterobacterias que sirven para la tipificación, identificación y análisis genético de las mismas (López-Ramírez *et al.*, 2018). Se han utilizado como base de un método para tomar huellas dactilares de genomas bacterianos y para evaluar la variabilidad genética de las cepas bacterianas (Soltani *et al.*, 2012; Tanko *et al.*, 2021).

Las secuencias ERIC se ubican en regiones extragénicas del genoma bacteriano y son considerados elementos móviles de DNA en asociación con los elementos transponibles invertidos en miniatura (MITEs por sus siglas en inglés “miniature inverted-repeat transposable elements”) (Ranjbar *et al.*, 2017). También son secuencias conservadas, su posición y el número de copias varía entre diferentes especies y cepas, por lo que se utiliza como marcador genético (Ranjbar *et al.*, 2014).

Usando estas secuencias ha sido posible discriminar serotipos estrechamente relacionados de una misma especie o grupos de cepas no relacionadas clonalmente, al presentar alto grado de poder discriminatorio (López-Ramírez *et al.*, 2018; Tanko *et al.*, 2021).

Identificación molecular bacteriana

Reacción en Cadena de la Polimerasa

La PCR es una técnica de diagnóstico molecular ampliamente utilizada por ser específica, rápida, sensible y versátil, para detectar un fragmento de DNA específico (Castro-Escarpulli *et al.*, 2015; Palomino-Camargo & González-Muñoz, 2014). Consiste en obtener *in vitro* millones de copias de una secuencia de DNA de interés, para lograrlo se simula lo que ocurre durante la replicación celular, para ello, se requiere de una polimerasa termoestable, los iniciadores o primers para seleccionar la región a amplificar (fragmentos de DNA de 15-30 nucleótidos que aportan el extremo 3' libre para que inicie la transcripción), los desoxirribonucleótidos (dNTPs), cloruro de magnesio (MgCl₂) u otro co-factor necesario para que trabaje la polimerasa, el DNA con el o los fragmentos que se amplificarán y una solución amortiguadora o buffer para mantener el pH idóneo para realizar la síntesis de DNA. Esta mezcla se somete a la repetición de varios ciclos a diferentes temperaturas (ciclo de PCR) que sustituye a la mayoría de las proteínas que actúan en la replicación celular (Castro-Escarpulli *et al.*, 2015; Culbreath *et al.*, 2016; Espinosa, 2007; Reinoso *et al.*, 2022).

Electroforesis

La PCR va acompañada de la técnica molecular electroforesis, que permite visualizar los fragmentos amplificados en un gel de agarosa o poliacrilamida. Esta técnica consiste en separar los fragmentos de DNA dependiendo el tamaño de cada uno, el gel actúa como una matriz porosa con agujeros de diferentes tamaños (50

nm hasta más de 200 nm) que, con una corriente eléctrica permite separar los fragmentos amplificados al atraerlos hacia el polo positivo, recordando que la carga del DNA es negativa debido a la presencia de grupos fosfato (P^-). La velocidad con la que los fragmentos atraviesan la matriz porosa depende del tamaño de la molécula, los fragmentos más pequeños atraviesan más rápido el gel, mientras que los fragmentos grandes se enlentecen, de esta manera, los fragmentos con el mismo tamaño migran a ritmos similares y se agrupan formando una banda (Espinosa, 2007; Reinoso *et al.*, 2022).

Las bandas en el gel se observan a través de un transiluminador de luz ultravioleta (UV), para lo cual, se le tiene que agregar algún colorante, como SYBR Safe, azul de bromofenol o bromuro de etidio, éste último es el utilizado con mayor frecuencia, se intercala entre las bases del DNA que permite visualizarlo al ser iluminado con la luz UV (Reinoso *et al.*, 2022).

Secuencias utilizadas para la identificación

Existen genes “estables” que permiten establecer relaciones filogenéticas entre las bacterias, como lo son aquellos genes que codifican para las subunidades ribosómicas 5S, 16S, 23S. El gen 16S rRNA, es un polirribonucleótido codificado por el gen *rrs* o DNA ribosómico rRNA 16S incluido en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano (Fernández *et al.*, 2010). Este gen es el más utilizado dentro de la taxonomía bacteriana, al estar presente en todas las bacterias y mantener regiones altamente conservadas (con una tasa de mutación baja) que actúan como dianas de cebadores para la amplificación de este gen. Los genes que codifican para los RNA ribosomales se organizan en operones (*rrn*), cuya estructura incluye dos promotores (P1 y P2), los genes rRNA 16S (*rrs*), 23S (*rrl*) y 5S (*rrf*), separados por regiones intergénicas (Espejo & Plaza, 2018). El número de copias del operón ribosómico en procariontes varía entre especies y va de 1 a 4 copias en arqueas y de 1 a 15 copias en bacterias (Stoddard *et al.*, 2015), algunos ejemplos se muestran en la Tabla 1, para *E. coli* se han identificado 7 operones *rrn* presentes en su

genoma. El operón *rrn* presenta regiones comunes en todos los organismos bacterianos y variaciones que se concentran en zonas específicas (Rodicio & Mendoza, 2004). En el gen 16S rRNA se encuentran unas secuencias cortas denominadas oligonucleótidos firma, estas secuencias son específicas y exclusivas para cada taxón (Zahariev *et al.*, 2018). Estas secuencias son las responsables de que el 16S rRNA brinde información útil y rápida sobre la identificación y filogenia bacteriana, mediante la comparación de su secuencia con bases de datos públicas que contienen un amplio número de secuencias bacterianas (Bou *et al.*, 2011; Culbreath *et al.*, 2016), de esta manera se ha implementado la secuenciación del gen 16S rRNA para la identificación de las diferentes cepas de *E. coli*.

Existen otras secuencias y regiones intergénicas presentes en el genoma bacteriano que permiten la identificación y tipificación de las mismas, como los genes constitutivos: *gyrB* (codifica la subunidad β de la DNA girasa), *rpoB* (codifica la subunidad β de la RNA polimerasa), *sodA* (codifica para la superóxido dismutasa dependiente de manganeso), *tuf* (factor de elongación termoestable), *recA*, *secA*, *rpoD*, *atpD*, *infB*, *groEL* y *ypmoA*, y algunos otros como el elemento de inserción IS6110, además de genes asociados a la resistencia frente antibióticos, genes de virulencia que brindan la capacidad patogénica y de infección a las bacterias, y plásmidos (Castro-Escarpulli *et al.*, 2015; Cortés-López *et al.*, 2020; Culbreath *et al.*, 2016; Ranjbar *et al.*, 2014).

Tabla 1. Número de operones ribosómicos (*rrn*) en algunas especies de bacterias.

Cepa	Operones <i>rrn</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i> J 6276tet1	3
<i>Chlamydia trachomatis</i> RC J s 122	2
<i>Clostridium lentocellum</i> DSM 5427	11
<i>Desulfotomaculum gibsoniae</i> DSM 7213	8
<i>Escherichia coli</i> APEC O1	7
<i>Escherichia coli</i> CFT073	7
<i>Pectobacterium carotovorum</i> PCC21	7
<i>Photobacterium profundum</i> SS9	14
<i>Salmonella bongori</i> NCTC 12419	5
<i>Thermoanaerobacter brockii finnii</i> Ako 1	4
<i>Thermoanaerobacter pseudetanolicus</i> ATCC 33223	4
<i>Shigella dysenteriae</i> 1617	7
<i>Bacillus velezensis</i> AS43.3	9
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI 5482	5
<i>Desulfotomaculum acetoxidans</i> DSM 771	10
<i>Yersinia enterocolitica</i> 105.5R r	7
<i>Borrelia afzelii</i> HLJ01	2
<i>Clostridium tetani</i> 12124569	4
<i>Listonella anguillarum</i> M3	7
<i>Streptococcus suis</i> JS14	4
<i>Vibrio anguillarum</i> 775	7
<i>Exiguobacterium antarcticum</i> B7	9

Adaptado de Tian *et al.*, (2015).

Mecanismos de acción de los antibióticos

Los antibióticos son fármacos, implementados en el tratamiento clínico contra infecciones provocadas por bacterias en humanos y animales, esto lo consiguen matando a las bacterias o inhibiendo su crecimiento y multiplicación (CDC, 2022b).

Los mecanismos de acción de los antibióticos se pueden agrupar en cinco: inhibición de la síntesis de la pared celular, destrucción de la membrana celular, inhibición de síntesis de ácidos nucleicos, inhibición de síntesis de proteínas y bloqueo de las vías metabólicas (Tabla 2) (Baran *et al.*, 2023; De La Fuente *et al.*, 2015; Etebu & Ariekpar, 2016).

Tabla 2. Mecanismos de acción de los antibióticos.

Mecanismos de acción	Ejemplo
Inhibición de la síntesis de la pared celular	β -lactámicos Glucopéptidos
Destrucción de la membrana celular	Lipopéptidos cíclicos Polimixinas
Inhibición de síntesis de ácidos nucleicos	RNA Rifaminidas
	DNA Quinolonas Nitroimidazoles
Inhibición de síntesis de proteínas	Aminoglucósidos Tetraciclinas Lincosamidas Macrólidos
Bloqueo de las vías metabólicas	Sulfonamidas/trimetoprim.

Inhibición de la síntesis de la pared celular

La pared celular es la responsable de brindar la forma celular a la bacteria, además de protegerla de lisis celular al soportar la elevada presión osmótica del citoplasma y permite el anclaje de componentes de membrana y proteínas extracelulares (Guilhelmelli *et al.*, 2013; Pírez & Mota, 2008). La pared celular está compuesta por peptidoglicano o mureína que es un gran polímero de aminoácidos y azúcares, formado por la unión cíclica y repetitiva de un dímero de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico mediado por uniones β 1-4, y una fracción peptídica formada por un tetrapéptido, unido a la molécula de N-acetilmurámico, y constituida por L-alanina, D-glutámico, ácido mesodiaminopimélico en bacilos Gram negativos o L-lisina en Gram positivos (Carrol *et al.*, 2016; Johnson *et al.*, 2013; Kirmusaoğlu *et al.*, 2019).

De acuerdo con Calvo & Martínez-Martínez (2009) la síntesis de la pared celular bacteriana se desarrolla en 3 fases: la citoplásmica, el transporte a través de la membrana y la organización final. En cada una de estas fases pueden actuar los antibióticos, cualquier falla o defecto en la pared celular conlleva a la lisis celular. Existen dos grupos principales que actúan sobre la síntesis de la pared celular, los β -lactámicos y glucopéptidos (vancomicina, teicoplanina y avoparcina), sin embargo, hay otros ejemplos de antibióticos como la fosfomicina, cicloserina, bacitracina y estreptograminas (Baran *et al.*, 2023; Calvo & Martínez-Martínez, 2009; Errecalde, 2004; Etebu & Arikekpar, 2016; Kirmusaoğlu *et al.*, 2019).

Destrucción de la membrana celular

La membrana celular es una estructura de vital importancia, pues en ella se realiza el proceso metabólico de la respiración celular, es decir, la fosforilación, oxidación, y transporte de electrones (citocromos) para la producción de energía (Pírez & Mota, 2008). Su composición es similar a las membranas de eucariotas, es una bicapa lipídica, formada por fosfolípidos, insertas en ella se encuentran

múltiples proteínas transmembrana, que facilitan el transporte de sustancias hidrofílicas (Calvo & Martínez-Martínez, 2009; Carrol *et al.*, 2016).

Entre los antibióticos cuya acción conduce a la ruptura de la membrana celular bacteriana se encuentran los lipopéptidos cíclicos y polimixinas que presentan actividad de tipo detergente que disrumpen la porción fosfolipídica de la membrana aumentando la permeabilidad de ésta y como consecuencia provoca la fuga de iones (principalmente potasio y sodio) y una disminución en el potencial transmembrana (Baran *et al.*, 2023; Errecalde, 2004; Etebu & Ariekpar, 2016; Guilhelmelli *et al.*, 2013; Kirmusaoğlu *et al.*, 2019).

Inhibición de síntesis de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos son un tipo de biomoléculas esenciales para la vida, éstos son el DNA y RNA (ácido ribonucleico). El DNA contiene la información genética de cada organismo y es responsable de su expresión, por ejemplo, éste codifica la información necesaria para que las células produzcan proteínas (Ramírez & Gómez, 2003). El RNA se presenta en diferentes formas moleculares (rRNA, tRNA, mRNA) que cumplen funciones celulares múltiples, incluyendo la síntesis proteica (Cortés, 2003; NIH, 2023a).

Algunos ejemplos de antibióticos que dañan a los ácidos nucleicos son las rifamicinas y las quinolonas que actúan sobre enzimas que participan en los procesos de transcripción (RNA polimerasa dependiente de DNA) y replicación (DNA-girasa); los nitroimidazoles (dimetridazol, metronidazol y tinidazol) dan lugar a la disrupción de las cadenas de DNA, impidiendo su reparación; los nitrofuranos impiden la lectura codónica DNA-mRNA (Baran *et al.*, 2023; Calvo & Martínez-Martínez, 2009; Errecalde, 2004; Etebu & Ariekpar, 2016; Kirmusaoğlu *et al.*, 2019).

Inhibición de síntesis de proteínas

Las proteínas son biomoléculas que cumplen diversas funciones y son vitales para la vida de un organismo, está formada por una o más cadenas largas, plegadas de aminoácidos, cuyas secuencias están determinadas por la secuencia de DNA del gen que codifica la proteína. Las proteínas pueden ser enzimas, ser parte estructural de la célula, formar canales de membrana, entre otras funciones (NIH, 2023b; Soberón, 2003).

La síntesis de proteínas es uno de los procesos más frecuentemente afectados por la acción de los antimicrobianos, y su inhibición selectiva es posible gracias a las diferencias estructurales entre los ribosomas bacterianos y eucariotas (Calvo & Martínez-Martínez, 2009). Este proceso se desarrolla en varias fases, en las cuales actúan diferentes antibióticos, por ejemplo, los aminoglucósidos y aminociclitolos actúan a nivel de la porción 30S del ribosoma, induciendo errores en la lectura de la información aportada por el mRNA, por lo que la proteína sintetizada contendrá errores y no será útil. Las tetraciclinas también se unen al ribosoma en la porción 30S, en forma similar a lo que ocurre con los aminoglucósidos. Cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol, actúan a nivel de la porción 50S del ribosoma, inhibiendo la transpeptidasa, lo que impide que se formen los péptidos. Lincosamidas y macrólidos, también se unen a la porción 50S, impidiendo la acción de la peptidiltransferasa interfiriendo en el proceso de la elongación de la síntesis de proteica (Baran *et al.*, 2023; Calvo & Martínez-Martínez, 2009; Errecalde, 2004; Etebu & Arikekpar, 2016; Kırmusaoğlu *et al.*, 2019).

Bloqueo de las vías metabólicas

Uno de los ejemplos más conocidos es la inhibición de la síntesis de ácido fólico en células bacterianas, principalmente por sulfonamidas solas o en combinación con trimetoprim. Las sulfonamidas son análogos estructurales del ácido paraaminobenzoico (PABA por sus siglas en inglés “para-aminobenzoic acid”)

que, a su vez, es necesario para la síntesis de folato por parte de las bacterias. Cuando se agotan las reservas de folato, se bloquea la biosíntesis de purinas, pirimidinas y algunos aminoácidos necesarios para la producción de DNA y proteínas, lo que conduce a la inhibición del crecimiento bacteriano (Baran *et al.*, 2023; Calvo & Martínez-Martínez, 2009; Etebu & Arikekpar, 2016; Kirmusaoğlu *et al.*, 2019).

Resistencia antimicrobiana

El uso de antibióticos se ha ido incrementado en la producción animal, provocando la aparición de bacterias resistentes a estos fármacos (Carhuapoma *et al.*, 2020). La resistencia a antibióticos se puede dar a través de dos vías: evolución vertical, gracias a mutaciones en el genoma y que se transmiten a las generaciones siguientes, y transferencia horizontal, en la que los genes de resistencia son adquiridos a partir de otras bacterias (conjugación, transducción o transformación) y después se heredan a la progenie bacteriana (Mancuso *et al.*, 2021). Las bacterias que presentan resistencia de 3 a 7 antibióticos se clasifican como multirresistentes (MDR), si la resistencia es a 8 o 9 antibióticos se clasifican con resistencia extendida (XDR) y si son resistentes a 10 o más antibióticos se agrupan como panresistentes (PDR) (Jiménez *et al.*, 2019), el surgimiento de este tipo de bacterias es considerada por la OMS como uno de los principales problemas en salud pública del siglo XXI (Tacconelli *et al.*, 2017), pues se estima que para 2050 las muertes causadas por bacterias multirresistentes alcanzarán cifras de 10 millones al año (O'Neill, 2016); mientras que en 2019 las defunciones en el mundo fue de 4.95 millones asociadas a bacterias multirresistentes (Murray *et al.*, 2022).

Mecanismos de resistencia

Existen múltiples mecanismos desarrollados por las bacterias que hacen posible la resistencia a los antibióticos. Existe la resistencia natural o intrínseca en las bacterias, si éstas carecen de diana para el fármaco, se trata de un mecanismo

constante y determinado genéticamente. También está la resistencia adquirida, resultado de la modificación genética de las bacterias, ya sea por mutaciones cromosómicas o por mecanismos de transferencia genética (plásmidos, transposones e integrones) (Pérez-Cano & Robles-Contreras, 2013; Reygaert, 2018).

Los mecanismos de resistencia se pueden agrupar en tres tipos principales (Tabla 3): disminución de la concentración del fármaco, modificaciones en el sitio diana del antibiótico y modificación del antimicrobiano.

Tabla 3. Mecanismos de resistencia.

Mecanismo de resistencia		Ejemplos
Disminución de la concentración del fármaco	Reducción de la permeabilidad	Porinas
	Expulsión del antimicrobiano	Bombas transportadoras
Modificaciones en el sitio diana del antibiótico	Protección del sitio diana	tet(M) y tet(O) que codifican proteínas de protección ribosómica
	Mutación de genes que codifican el sitio blanco	Mutaciones puntuales que como resultado sustituyen aminoácidos en el gen rpo
	Alteración enzimática del sitio diana	Enzima Cfr
	Reemplazo completo o desvío del sitio diana	Formación de PBP2a
Modificación del antimicrobiano	Modificación mediante hidrólisis	β -lactamasas
	Modificación mediante la adición de grupos funcionales	Acetilación, fosforilación y adenilación

Disminución de la concentración del fármaco

A) **Reducción de la permeabilidad:** la membrana externa de las bacterias Gram negativas, forman una barrera impermeable a muchos antimicrobianos (Chávez-Jacobo, 2020). Los fármacos hidrofílicos pueden

atravesar la membrana mediante difusión a través de canales llamadas porinas, usualmente no son específicas (Kojima & Nikaido, 2013). La resistencia se logra mediante la disminución en la cantidad de porinas y con mutaciones que cambian la selectividad del canal de la porina (Reygaert, 2018).

B) Expulsión del antimicrobiano: las bacterias han adquirido sistemas de expulsión múltiple codificados por genes dentro de sus cromosomas, en plásmidos, transposones o genes de origen vírico (Chávez-Jacobo, 2020). Actualmente, se han identificado seis familias de bombas transportadoras capaces de conferir resistencia a los antimicrobianos. La familia ATP-cassettes de unión (ABC por sus siglas en inglés “ATP-binding cassette”), que utilizan directamente al ATP como fuente de energía para realizar el transporte, mientras que las otras cinco familias de transportadores funcionan a través del potencial de membrana; la superfamilia de facilitadores principales (MFS por sus siglas en inglés “major facilitator superfamily”), la familia pequeña de resistencia a múltiples fármacos (SMR por sus siglas en inglés “small multidrug resistance”), la familia de división celular de nodulación de resistencia (RND por sus siglas en inglés “resistance nodulation cell division”), la familia de extrusión de compuestos tóxicos y multidroga (MATE por sus siglas en inglés “multidrug and toxic compound extrusion”) y los sistemas de expulsión de proteobacterias (PACE por sus siglas en inglés “proteobacterial antimicrobial compound efflux”). Estas familias difieren en términos de conformación estructural, fuente de energía, rango de sustratos que son capaces de extruir y en el tipo de organismos bacterianos en los que se distribuyen (Du *et al.*, 2018; Munita & Arias, 2016; Troncoso *et al.*, 2017).

Modificaciones en el sitio diana del antibiótico

Los antibióticos tienen afinidad por su sitio blanco, al cual se unen y llegan a desestabilizar las funciones normales de la bacteria, por ello, cambios en la estructura del blanco que impidan su unión con el fármaco confieren resistencia (Chávez-Jacobo, 2020).

A) **Protección del sitio diana.** La protección del sitio diana se da mediante proteínas, algunos ejemplos de fármacos afectados por este mecanismo son la tetraciclina (Tet[M] y Tet[O]), fluoroquinolonas (Qnr) y ácido fusídico (FusB y FusC). El caso de los determinantes de resistencia a la tetraciclina Tet(M) y Tet(O) es el más estudiado, se han encontrado en plásmidos y en transposones conjugativos de amplio rango. Estas proteínas pertenecen a la superfamilia de factores de traducción de las GTPasas, actúan como homólogos de los factores de elongación (EF-G y EF-Tu) e interactúan con el ribosoma y desalojan la tetraciclina de su sitio de unión (Li *et al.*, 2013; Troncoso *et al.*, 2017).

B) **Mutaciones en genes que codifican el sitio blanco:** un ejemplo es la resistencia a la rifampicina, ésta inhibe la RNAPolimerasa dependiente de DNA, por lo que evita la transcripción. El sitio de unión de la rifampicina está en la subunidad β de la RNAPolimerasa (codificada por *rpoB*), la resistencia a este fármaco se da por mutaciones puntuales que dan como resultado sustituciones de aminoácidos en el gen *rpoB* (Reygaert, 2018). Otro ejemplo son las mutaciones en los genes *gyrA-gyrB* (DNAGirasa) y *parC-parE* (topoisomerasa IV) que confieren resistencia a las fluoroquinolonas, ya que este compuesto interactúa con las enzimas DNAGirasa y topoisomerasa IV esenciales para la supervivencia bacteriana (Bharadwaj *et al.*, 2022; Munita & Arias, 2016; Reygaert, 2018; Troncoso *et al.*, 2017). También existe la resistencia a las oxazolidinonas, éstos compuestos se unen al sitio A ribosómico, interfiriendo así con el

posicionamiento del aminoacil-tRNA e inhibiendo la síntesis de proteínas. La resistencia se adquiere por mutaciones en genes que codifican el dominio V del rRNA 23S y/o las proteínas ribosómicas L3 (*rpIC*) y L4 (*rpID*), la metilación de A2503 en el rRNA 23S mediado por la enzima Cfr (Reygaert, 2018).

C) Alteración enzimática del sitio diana: los genes *erm* brindan protección contra antibióticos mediada por la metilasa del rRNA. Las enzimas que codifican los genes *erm* llegan a mono o dimetilar un residuo de adenina en la posición A2058 del dominio V del 23 rRNA de la subunidad ribosomal 50S. Confiere resistencia frente a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B, ya que éstos tienen sitios de unión superpuestos en el rRNA 23S (Chávez-Jacobo, 2020; Pérez-Cano & Robles-Contreras, 2013; Reygaert, 2018). Otro ejemplo es la enzima Cfr codificada por el gen *cfr*, pertenece a la familia de las S-adenosil-L-metionina (SAM) y confiere resistencia a fenicoles, lincosamidas, pleuromutilinas y estreptogramina (Reygaert, 2018).

D) Reemplazo completo o desvío del sitio diana: uno de los ejemplos más estudiados de este mecanismo es la formación de PBP2a (proteínas de unión a penicilina exógena) por el gen *mecA* en *Staphylococcus aureus*. Las PBP (proteína de unión a penicilina) son enzimas transpeptidasas involucradas en la formación de peptidoglicano en la pared celular bacteriana y son el sitio de unión para fármacos β -lactámicos, la PBP2a tiene baja afinidad por estos antibióticos, lo que confiere resistencia a penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos (Bharadwaj *et al.*, 2022; Munita & Arias, 2016; Reygaert, 2018). Algunos glicopéptidos como la vancomicina y teicoplanina actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular, éstos se unen a la D-alanina-D-alanina terminal de la fracción pentapeptídica de los precursores de peptidoglicano. La resistencia a estos fármacos está asociada a la adquisición de un grupo de genes

denominados *van*, que cambian la estructura de los precursores de peptidoglicano, provocando una disminución en la unión de estos fármacos a su diana (Bharadwaj *et al.*, 2022; Munita & Arias, 2016; Reygaert, 2018). La daptomicina es un lipopéptido que actúa despolarizando la membrana celular y necesita de calcio para lograr unirse. Mutaciones en el gen *mprF* hacen que la carga de la superficie de la membrana celular sea positiva, inhibiendo la unión del calcio y, por ende, de la daptomicina (Reygaert, 2018). Otra estrategia que se ha encontrado en las bacterias es la producción de más sitios de unión para el antibiótico. Un ejemplo de este mecanismo es la resistencia a sulfonamidas y trimetoprima, quienes se unen a las enzimas involucradas en la biosíntesis de folato, el ácido dihidropterico sintasa (DHPS) y dihidrofolato reductasa (DHFR) respectivamente. El mecanismo consiste en mutaciones en la región promotora de estas enzimas, ocasionando la sobreproducción de DHPS y DHFR, superando así la capacidad de los fármacos para inhibir la síntesis de folato (Munita & Arias, 2016; Reygaert, 2018).

Modificación del antimicrobiano

A) **Modificación mediante hidrólisis:** la modificación enzimática de los antimicrobianos es uno de los mecanismos más eficientes para inactivarlos (Chávez-Jacobo, 2020). Las β -lactamasas son un grupo amplio de enzimas hidrolizantes de fármacos β -lactámicos, al destruir el enlace amida del anillo β -lactámico, haciendo ineficaz al fármaco (Bharadwaj *et al.*, 2022; Reygaert, 2018; Troncoso *et al.*, 2017). Los genes codificantes de estas enzimas se ubican en el cromosoma bacteriano, en elementos genéticos móviles (MGE por sus siglas en inglés “movable genetic elements”) y también se han encontrado en integrones facilitando su diseminación (Munita & Arias, 2016). La tetraciclina puede inactivarse por hidrolización, a través del gen *tet*, también existen muchas otras

enzimas capaces de hidrolizar aminoglucósidos, fenicoles y macrólidos (Chávez-Jacobo, 2020; Reygaert, 2018).

B) Modificación mediante la adición de grupos funcionales: la adición enzimática de grupos funcionales provoca resistencia debido a que disminuye la afinidad del antimicrobiano por su sitio blanco (Chávez-Jacobo, 2020). Los grupos químicos que suelen transferirse al fármaco son los acetilo, fosforilo y adenilo. La acetilación es el mecanismo más frecuente, actúa contra aminoglucósidos, cloranfenicol, estreptograminas y fluoroquinolonas; la fosforilación se utiliza contra aminoglucósidos y cloranfenicol; la adenilación afecta a aminoglucósidos y lincosamidas (Bharadwaj *et al.*, 2022; Munita & Arias, 2016; Reygaert, 2018).

Integrones

Los integrones funcionan como un mecanismo para la resistencia antimicrobiana, proporcionan un mecanismo eficiente y simple para la adición de nuevos genes de resistencia en los cromosomas bacterianos, aunado a la maquinaria necesaria para garantizar su expresión: una estrategia robusta de intercambio genético y uno de los principales impulsores de la evolución bacteriana (Munita & Arias, 2016).

Se trata de elementos genéticos que pueden integrar genes exógenos que confieren a las bacterias diferentes características (resistencia antimicrobiana, nuevas funciones bioquímicas o factores de virulencia) estos genes se denominan casete (Yauri *et al.*, 2016). Los integrones constan de tres elementos, que les permite la captura de genes casete y permite la expresión de los mismos, un gen que codifica para la integrasa (*intI*), seguido de una secuencia *attI* a la que se unen los casetes y es donde se da la recombinación sitio-específica, y por último un promotor (P_{ant}) para la expresión de los genes casete integrados (Coque-González, 2005; Di Conza & Gutkind, 2010; Sabaté & Prats, 2002; Yauri *et al.*, 2016).

Se han descrito nueve clases de integrones, basado en la secuencia de la integrasa, de los cuales, la clase 1, 2 y 3 contienen genes asociados a la resistencia antimicrobiana. Los integrones clase 1 son los más frecuentes en aislados clínicos, asociados a bacilos Gram negativos dentro de las enterobacterias (Sabaté & Prats, 2002). También son conocidos como “integrones móviles” al ubicarse en plásmidos, contrario a los de la clase 2 que están presentes a nivel cromosómico (Fuentes *et al.*, 2013). Los integrones clase 1 se conforman de dos regiones conservadas, una con el gen que codifica para la integrasa 1 (*intI1*), seguido el segmento de unión *attI1* que captura los genes casete asociados a la resistencia y con uno o más promotores para expresar esos genes, la segunda región conservada que contiene los genes *qacEΔ1* y *sul1*, que confieren resistencia a desinfectantes, compuestos de amonio cuaternario y sulfonamidas (Wan & Chou, 2015).

Los integrones clase 1 son los más abundantes en aislados clínicos de diversas especies de bacterias, derivado de la capacidad para recombinarse con sitios *attC* dispares e incluso con secuencias de nucleótidos con menos similitud (Kaushik *et al.*, 2018; Mazel, 2006)

Presencia a de *Escherichia coli* enteropatógena en carne molida obtenida en punto de venta del municipio de Huasca de Ocampo, Hidalgo

III. Hipótesis

La carne comercializada en el municipio de Huasca de Ocampo, Hidalgo puede presentar contaminación con los diferentes enteropatotipos de *E. coli* causales de enfermedades diarreicas y que también presentan multirresistencia.

IV. Justificación

A pesar de que *E. coli* es un habitante natural de la microbiota intestinal de humanos y animales rumiantes, se han detectado ciertos patotipos responsables de enfermedades tanto en animales como en humanos. Siendo un agente etiológico importante causal de ETAs, al contaminar la carne de bovino destinada para el consumo humano, provocando enfermedades denominadas diarreogénicas. Aunado a ello, el surgimiento de cepas multirresistentes a causa del uso indiscriminado y no controlado de antibióticos se ha convertido en uno de los problemas de salud pública con mayor importancia, debido al impacto que presenta en la salud de la población humana. Esta investigación pretende evaluar la contaminación en carne molida por *E. coli*, determinando dos factores, el potencial patogénico y la resistencia a antibióticos, en el municipio de Huasca de Ocampo, Hidalgo para conocer la calidad de la carne y el potencial riesgo a brotes de infección por *E. coli*.

V. Objetivos

Objetivo general

Determinar e identificar la presencia de enteropatotipos de *E. coli* en carne molida de origen bovino, mediante técnicas bioquímicas y moleculares con el fin de advertir el riesgo de posibles brotes epidémicos.

Objetivos específicos

Aislar e identificar a *E. coli* usando técnicas convencionales para comprobar la contaminación de la carne molida por esta especie.

Tipificar y caracterizar a cepas de *E. coli* patógenas mediante el uso de técnicas moleculares para conocer el patotipo al que pertenecen.

Determinar la diversidad genética de los aislado de *E. coli* mediante la técnica ERIC-PCR para conocer si comparten el mismo origen.

Evaluar la resistencia a antibióticos que presenta *E. coli* aislada de carne molida utilizando el método de Kirby-Bauer, para informar el impacto que presenta en la salud pública.

VI. Materiales y métodos

Sitio de muestreo

Las muestras se colectaron en el Municipio de Huasca de Ocampo, Hidalgo (20° 12' 10" latitud norte y entre 98° 35' 55" longitud oeste), el cual cuenta con 10 carnicerías distribuidas en el centro de Huasca y las comunidades de La Loma, San Miguel Regla y Puente de Doria (Figura 1).

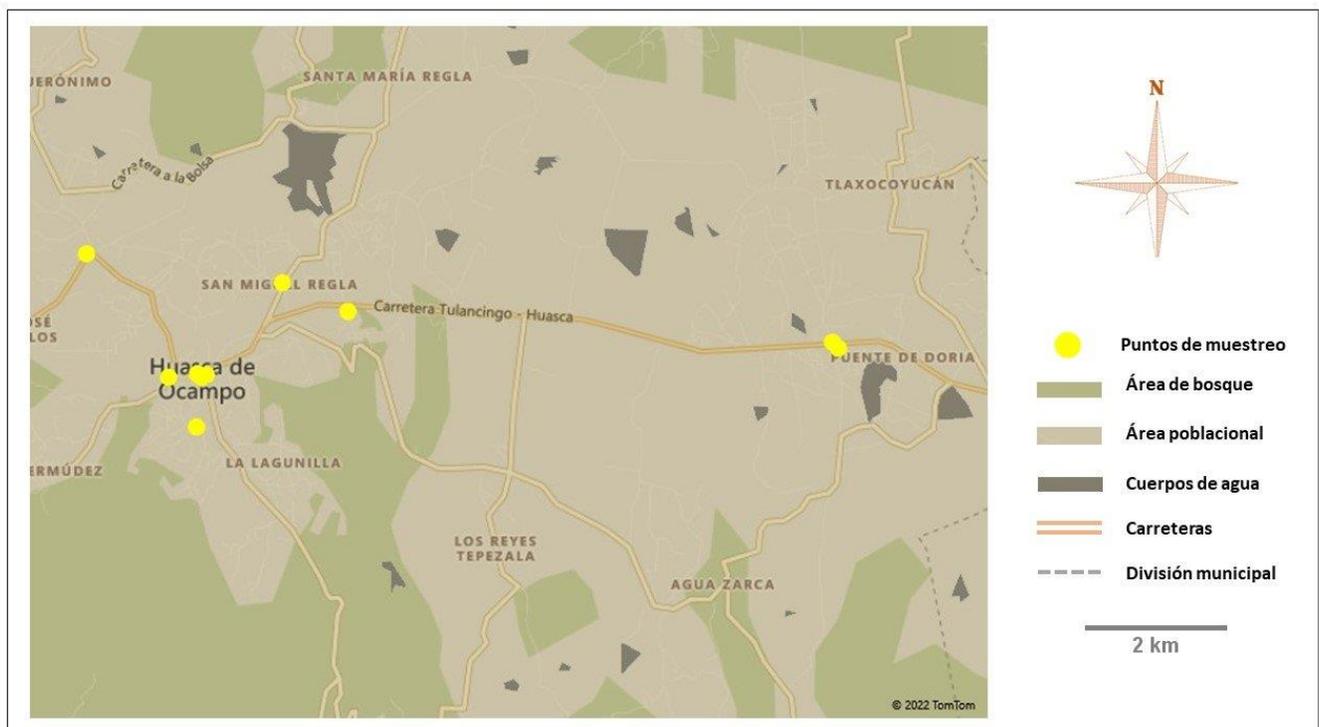


Figura 1. Ubicación de los puntos de muestreo en el Municipio de Huasca de Ocampo, Hidalgo.

Toma de muestra

Se solicitó a cada vendedor 50 gr de carne molida de res, triturada al instante. Las muestras se colocaron en un recipiente estéril y se mantuvieron en refrigeración para ser trasladadas al laboratorio de Parasitología y Bacteriología de docencia del Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia del Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, para su procesamiento, según lo estipula la Norma Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-201 (DOF, 2019).

Aislamiento

Se siguió la metodología reportada por Reyes-Rodríguez *et al* (2013) con modificaciones, para lo cual, cada muestra se enriqueció en agua peptonada al 1%, en tubos para centrifuga de 15 mL se colocaron 3 mL de agua peptonada estéril y 1 gr de carne, las muestras se incubaron por 24 horas a 37 °C.

Se inocularon por gota con un asa bacteriológica y se sembró por estría en cajas Petri con agar MacConkey (Mc) MCD LAB® (No. catálogo 7111) y agar MacConkey con sorbitol (McS) BD Difco™® (No. catálogo 279100), se incubaron por 24 horas a 37 °C. Se aislaron las colonias con la morfología característica para *E. coli*, del agar Mc se tomaron las colonias lactosa positivo, que son color rosa con presencia de un halo difuso (Allen, 2005); del agar McS se eligieron las colonias sorbitol negativo, que se caracterizan por ser transparentes (Zimbro *et al.*, 2009). Las colonias sospechosas se sembraron en agar eosina y azul de metileno (EMB) DIBICO® (No. Catálogo 1011-A) para confirmar la presencia de *E. coli*, se incubaron por 24 horas a 37 °C; se seleccionaron aquellas colonias con la morfología característica para *E. coli*, es decir, aquellas que presentaron brillo verde metálico (Lal & Cheeptham, 2007).

Identificación bacteriana

Tinción

Las colonias sospechosas de *E. coli* se tiñeron mediante la técnica de Gram. Para lo cual se utilizó el tren de tinción de Gram de HYCEL® (No. catálogo 541). Se fijó la muestra en un portaobjetos, posterior a ello se agregó cristal violeta, se dejó actuar por 1 minuto, se enjuagó con agua destilada, se agregó yodo-lugol y después de 1 minuto se enjuagó con agua destilada, posteriormente se agregó alcohol-acetona 30 segundos, se enjuagó con agua destilada y finalmente se agregó safranina, se dejó actuar por 1 minuto y se enjuagó con agua destilada. Una vez realizada la tinción, se observaron las muestras en un microscópico óptico a 100X con una gota de aceite de inmersión (Smith & Hussey, 2005).

Bioquímica

Las colonias presuntivas de *E. coli* se sometieron a las pruebas bioquímicas de: indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer, citrato y TSI (De la Maza *et al.*, 2004).

Para la prueba de indol se colocaron 3 mL de agar SIM DIBICO® (No. catálogo 1054-A) en tubos de 5 mL, se sembró con un asa recta y se incubó por 24 horas a 37 °C, posteriormente se adicionaron 10 gotas del reactivo de Kovac's SIGMA-ALDRICH (No. catálogo 60983), si la prueba es positiva el reactivo se torna de color rojo; si la prueba es negativa el reactivo se queda en un tono café (MacWilliams, 2009b).

En las pruebas de rojo de metilo y Voges-Proskauer se sembró en medio MR-VP DIBICO® (No. catálogo 1053-E), cada tubo contenía 2 mL de caldo, se tomó la colonia bacteriana con el asa bacteriológica, el periodo de incubación fue de 24 horas a 37 °C; posterior a ello, se agregaron 10 gotas del indicador de pH rojo de metilo para la prueba con ese nombre y para la prueba de Voges-Proskauer se

adicionó sulfato de cobre de amonio. La prueba rojo de metilo es positiva cuando después de agregar el rojo de metilo, el cultivo vira a un color rojizo; si es negativa el cultivo presenta color amarillo. Para la prueba de Voges-Proskauer, el cultivo se vira a un tono rosa-rojizo cuando es positiva; si la prueba es negativa el cultivo presenta un tono café (Mcdevitt, 2009).

En el caso de la prueba de citrato, se colocó 3.5 mL del medio citrato de Simmons DIBICO® (No. catálogo 1006-E) en cada tubo y se inclinó ligeramente a 22°, una vez sembrado, se incubó por 48 horas a 37 °C. Cuando las bacterias pueden crecer en este medio, se vira a color azul; si no hay crecimiento el medio se mantiene en su tono original verde (MacWilliams, 2009a).

Finalmente, para la prueba de TSI se sembró en medio tres azúcares y hierro DIBICO® (No. catálogo 1016-A), para ello se agregaron 3.5 mL de medio en cada tubo, se inclinaron ligeramente, con un ángulo de 22° y se realizó una siembra por punción combinada con estría, se incubaron por un lapso de 24 horas a 37 °C. En esta prueba cuando el medio es ácido se presenta una coloración amarilla, cuando el medio es alcalino la coloración es rojiza; la producción de gas se observa mediante la fragmentación y/o elevación del medio de cultivo (Lehman, 2005).

Las cepas de *E. coli*, de acuerdo con la literatura, presentan estas pruebas bioquímicas de la siguiente manera: indol +, rojo de metilo +, Voges Proskauer -, citrato -, en TSI presentan medio ácido (A) o alcalino (ALK), con producción de gas (AG) o sin la producción de gas. Con este criterio se eligieron a las cepas de *E. coli* (De la Maza *et al.*, 2004).

Extracción de DNA

La extracción de DNA bacteriano se realizó siguiendo el método descrito por Ribeiro *et al* (2016). En tubos para centrífuga de 15 mL se adicionaron 3 mL de caldo tioglicolato BD Bioxon® (No. catálogo 211721) y se inoculó con un asa

bacteriológica, se incubó por un periodo de 24 horas a 37 °C. Posterior a ello, se tomó 1 mL de cultivo y se colocó en tubos para microcentrífuga de 1.5 mL, se centrifugó 5 minutos a 14500 rpm y se retiró el sobrenadante. Se realizó un enjuague, al pellet con las bacterias se le adicionó 1 mL de agua destilada estéril, se agitó entre 2 y 5 minutos y se centrifugó por 5 minutos a 14500 rpm, se retiró el sobrenadante y al pellet resultante se le agregó 200 µl de buffer TE ((Tris-HCl [10mM]: EDTA [1 mM]), se agitó hasta mezclar el pellet. Las muestras se sometieron a calor a 100 °C durante 15 minutos y a frío a -20 °C durante 15 minutos. Después del choque térmico se centrifugó por 10 minutos a 14500 rpm, se recuperó el sobrenadante y se colocó en tubos para microcentrífuga estériles de 1.5 mL. Los tubos con el DNA se almacenaron en congelación a -20°C para usos posteriores.

Se midió la concentración y pureza del DNA en el espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop® ND-1000, como blanco se utilizó buffer TE. Se consideró la concentración de DNA con valor >50 ng/µl; la pureza se consideró como óptima con valor >1.8 en la absorbancia 260/280 y para la absorbancia 260/230 se consideraron valores óptimos >2.0 (Banco Nacional de ADN, 2020).

Amplificación gen 16S

Se amplificó el gen 16S rRNA, para ello se utilizó el kit para PCR GoTaq® Flexi DNA Polymerase (No. catálogo M8291) y se usaron los primers 27F (5´ AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3´) y 1492R (5´ GGTTACCTTGTTACGACTT 3´) (Henriques *et al.*, 2006). El volumen final de la reacción fue de 50µl, con concentración de: 1X de buffer, 2.0mM de MgCl₂, 0.2mM de dNTPs, 1µM de primer 27F, 1µM de primer 1492R, 1.25u de Taq polimerasa, 1µl de DNA, y 31.75µl agua (H₂O) libre de nucleasas. Se utilizó el termociclador para PCR Eppendorf®, con una desnaturalización inicial (93°C por 3 minutos), seguido de 35 ciclos de: desnaturalización (94°C por 1 minuto), asociación (56°C por 1 minuto) y extensión (72°C por 2 minutos), seguido de una extensión final (72°C por 10 minutos) (Zepeda-Velazquez *et al.*, 2023).

Para visualizar las amplificaciones, se utilizó la técnica de electroforesis, con gel de agarosa al 1.5% y se corrió durante 1 hora a 80V. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se colocó en el transluminador de luz ultravioleta (UV) (Reyes-Rodríguez *et al.*, 2013). Se visualizaron bandas con peso molecular de 1500 pb (Henriques *et al.*, 2006).

Sensibilidad antimicrobiana

La evaluación de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos se realizó mediante la prueba de susceptibilidad por difusión en disco de Kirby-Bauer (Hudzicki, 2009). Se utilizaron los sensidiscos Gram negativos MULTIBAC I.D. (idlab, México, CDMX) con 12 antibióticos: amikacina (AK 30 µg), ampicilina (AM 10 µg), carbenicilina (CB 100 µg), cefalotina (CF 30 µg), cefotaxima (CFX 30 µg), ciprofloxacino (CPF 5 µg), cloranfenicol (CL 30 µg), gentamicina (GE 10 µg), netilmicina (NET 30 µg), nitrofurantoína (NF 300 µg), norfloxacino (NOF 10 µg) y sulfametoxazol/trimetoprim (STX 25 µg).

La evaluación de la sensibilidad antibiótica se realizó en los aislados presuntivos para *E. coli*. Se tomaron de 1 a 3 colonias y se inocularon en tubos de ensayo con 5 mL de caldo tioglicolato, hasta conseguir una turbidez similar a 0.5 de la escala de MacFarland. En cajas Petri con agar Mueller-Hinton MCD LAB® (No. catálogo 7131) se inoculó el caldo con un hisopo estéril y cubriendo por completo la superficie del agar. Se esperó a que la superficie estuviera completamente seca y se colocaron los sensidiscos, se incubaron por 18 horas a 35 °C.(Hudzicki, 2009). Se realizó la medición de los halos de inhibición siguiendo las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017); el diámetro obtenido de cada antibiótico se comparó con una tabla provista por el proveedor MULTIBAC I.D, la cual está basada en los parámetros que establece el CLSI; se catalogaron como sensible (S), intermedio (I) y resistente (R).

Factores de virulencia

En este estudio se usaron cuatro genes de virulencia *stx 1*, *stx 2*, *eaeA* y *hlyA*. Se realizó la técnica de PCR múltiple, con el kit para PCR GoTaq® Flexi DNA Polymerase (No. catálogo M8291) y los siguientes primers: *stx1F* (5´ ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC 3´), *stx1R* (5´ AGAACGCCCACTGAGATCATC 3´), *stx2F* (5´ GGCACGTCTGAACTGCTCC 3´), *stx2R* (5´ TCGCCAGTTATCTGACATTCTG 3´), *eaeAF* (5´ GACCCGGCACAAGCATAAGC 3´), *eaeAR* (5´ CCACCTGCAGCAACAAGAGG 3´), *hlyAF* (5´ GCATCATCAAGCGTACGTTCC 3´), *hlyAR* (5´ AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT 3´) (Paton & Paton, 1998). El volumen final de la reacción fue de 25µl, con concentración de: 1X de buffer, 1.0mM de MgCl₂, 0.08mM de dNTPs, *stx1F* 1.0µM, *stx1R* 1.0µM, *stx2F* 1.0µM, *stx2R* 1.0µM, *hlyAF* 1.0µM, *hlyAR* 1.0µM, *eaeAF* 1.0µM, *eaeAR* 1.0µM, 1.0u de Taq polimerasa, 5.0µl de DNA, y 12.2µl H₂O libre de nucleasas. Se utilizó el termociclador para PCR Eppendorf® con 9 ciclos de: desnaturalización (95°C por 1 minuto), asociación (66°C por 2 minutos) y extensión (72°C por 1:30 minutos); 5 ciclos de: desnaturalización (95°C por 1 minuto), asociación (65.5°C por 2 minutos) y extensión (72°C por 1:30 minutos); 9 ciclos de: desnaturalización (95°C por 1 minuto), asociación (61.5°C por 2 minutos) y extensión (72°C por 1:30 minutos); finalmente 10 ciclos de: desnaturalización (95°C por 1 minuto), asociación (61°C por 2 minutos) y extensión (72°C por 2:30 minutos) (Paton & Paton, 1998).

Se visualizaron las bandas correspondientes a las amplificaciones de estos genes de virulencia, el gen *stx1* presenta un tamaño de 180 pb, el gen *stx2* de 255 pb, el gen *eaeA* de 384 pb y el gen *hlyA* de 534 pb (Paton & Paton, 1998). Se realizó una electroforesis, con gel de agarosa al 1.5%, se corrió durante 1 hora a 80V. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se colocó en el transluminador de luz ultravioleta (UV) (Reyes-Rodríguez *et al.*, 2013).

Integrasa

Para determinar la presencia de integrones clase I (*Int1-1*), primero se realizó una PCR para la integrasa clase I, cuyos primers son *Int11F* (5' CCTCCCGCACGATGATC 3') e *Int11R* (5' TCCACGCATCGTCAGGC 3') (Henriques *et al.*, 2006). Se utilizó el kit para PCR GoTaq® Flexi DNA Polymerase (No. catálogo M8291), la composición final de la reacción fue: buffer 1X, MgCl 1.0mM, dNTPs 0.4mM, Int11F 1.0µM, Int11R 1.0µM, Taq polimerasa 1.25u DNA 5.0µl y H₂O 27.75µl. Con una desnaturalización inicial (94°C por 5 minutos), seguido de 30 ciclos de: desnaturalización (94°C por 1 minuto), asociación (57°C por 1:30 minutos) y extensión (72°C por 4 minutos) y una extensión final (72°C por 10 minutos) (Henriques *et al.*, 2006).

El amplicón de la integrasa clase I cuenta con un tamaño de 280 pb, el cual se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, corrido por 1 hora a 80V. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se colocó en el transluminador de luz ultravioleta (UV) (Reyes-Rodríguez *et al.*, 2013).

Las cepas positivas para la *Int1-1* se sometieron a otra PCR para la amplificación de la región variable del integrón, utilizando los primers 5'_CS (5' GGCATCCAAGCAGCAAG 3') y 3'_CS (5' AAGCAGACTTGACCTGA 3') (Henriques *et al.*, 2006) y el kit para PCR GoTaq® Flexi DNA Polymerase (No. catálogo M8291). La mezcla de reacción para la PCR presentó volumen final de 50 µl con composición de: buffer 1X, MgCl 2.0mM, dNTPs 0.2mM, 5'_CS 1.0µM, 3'_CS 1.0µM, DNA 1.0µl, H₂O 31.75µl y Taq polimerasa 1.25u. Con una desnaturalización inicial (94°C por 1 minuto), seguido de 35 ciclos de: desnaturalización (94°C por 1 minuto), asociación (58.5°C por 1 minuto) y extensión (72°C por 5 minutos) y una extensión final (72°C por 1 minuto) (Henriques *et al.*, 2006).

La amplificación se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio, con corrida de 1 hora a 80V. En el transluminador de luz ultravioleta (UV) se colocó el gel para observar las bandas de la amplificación, éstas presentan tamaño variable (Reyes-Rodríguez *et al.*, 2013).

Secuenciación

Los productos de los que se obtuvieron su secuencia fueron los amplicones resultantes de la amplificación del gen 16S y la región variable del integrón. Para ello, primero se realizó la purificación de las copias obtenidas (16S y región variable *Int1-1*) con el kit de purificación Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, siguiendo la metodología del proveedor. Se realizó la lectura de la concentración y pureza en el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000. El amplicón resultante se mandó secuenciar al Laboratorio de Servicios Genómicos (LANGEBIO)-CINVESTAV. El análisis de las secuencias se realizó utilizando el programa MEGA 11, cada secuencia se introdujo al programa y se procedió a quitar los extremos del histograma para disminuir el ruido de fondo (aproximadamente 50 bases) y se convirtieron en formato FASTA, posteriormente cada secuencia se comparó en BLAST®, eligiendo el apartado de nucleótidos y la búsqueda se realizó usando la base de datos colección de nucleótidos (nr/nt) usando Megablast (optimizar para secuencias muy similares). La secuencia de cada región variable del integrón se comparó con secuencias de la base de datos de GenBank.

ERIC

Se determinó la presencia de las secuencias consenso intergénicas repetitivas de enterobacterias mediante la técnica ERIC-PCR, usando los primers ERICF (5' ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC 3') y ERICR (5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3') (Versalovic *et al.*, 1991) y el kit para PCR GoTaq® Flexi DNA Polymerase (No. catálogo M8291), la composición final de la reacción fue: buffer 1X, MgCl 3.0mM, dNTPs 0.2mM, ERICF 1.0µM, ERICR 1.0µM,

DNA 4.0µl, H₂O 26.5µl, Taq polimerasa 3.0u. Con 30 ciclos de: desnaturalización (94°C por 1 minuto), asociación (52°C por 1 minuto) y extensión (65°C por 8 minutos) y una extensión final (65°C por 16 minutos) (Versalovic *et al.*, 1991).

En este caso, la amplificación presenta diferente número de bandas con tamaños variables. El amplicón se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, corrido por 1:30 horas a 80V. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se colocó en el transluminador de luz ultravioleta (UV) (Reyes-Rodríguez *et al.*, 2013).

Para realizar el análisis clonal, se empleó el coeficiente de similitud Dice y el algoritmo UPGMA mediante el software GelJ para generar un dendrograma a partir del perfil electroforético obtenido del ERIC-PCR. El gel obtenido por electroforesis se capturó en una imagen, la cual se convirtió en tono blanco y negro, se subió al software GelJ, en el cual se elige el carril que tiene el marcador de peso molecular y los carriles que corresponden a los aislados; se selecciona las bandas obtenidas de cada aislado y se somete al análisis para la obtención del dendrograma, el cual se obtiene mediante el cálculo de la similitud entre carriles, basado en el número de bandas coincidentes y no coincidentes, es decir, se genera una matriz con la presencia y ausencia de bandas y se va comparando carril con carril. Se consideró como genotipo aquellos perfiles agrupados en cluster que presentaron un coeficiente de similitud mayor a 0.64 (López-Ramírez *et al.*, 2018).

Análisis de componentes principales (ACP)

Se realizó un análisis de componentes principales para analizar la distribución y asociación de la resistencia antimicrobiana y los genes de virulencia de los aislados de *E. coli*.

Para cada antibiótico se asignaron valores 1: sensible, 2: intermedio, 3: resistente y para los genes de virulencia 1: presencia y 0: ausencia (Kappell *et al.*, 2015). Se utilizó el programa estadístico PAST versión 4.03, primero se realizó la

prueba de normalidad multivariada, posteriormente se realizó agrupamiento por *clustering clásico*, utilizando el método de grupos pareados (UPGMA) y distancias de Gower (Darkwa *et al.*, 2020); también se realizó un agrupamiento de grupos (UPGMA) con prueba de dos vías y distancias de Gower.

Se realizó el agrupamiento utilizando el método de *k-medoids* (Irwansyah *et al.*, 2020) la asignación del número de clusters (3) se eligió siguiendo el método de codo, para la matriz de distancias se utilizó distancias de Gower. La significación estadística se evaluó mediante la prueba PERMANOVA de una vía con valores de $P < 0.05$.

VII. Resultados

Aislamiento e identificación bioquímica

En total se aislaron 20 cepas presuntivas de *E. coli*, dos por cada punto de muestreo. Con base en la morfología de bacilo Gram negativo (ver anexo 2) y con las pruebas bioquímicas de indol (+), rojo de metilo (+), Voges-Proskauer (-), citrato (-) y en TSI con o sin la producción de gas, con medio ácido u alcalino (Tabla 4).

Del total de cepas, 10 fueron lactosa positiva, aisladas del agar Mc y 10 fueron sorbitol negativo, aisladas del agar McS. Las cuales se sembraron en medio EMB para confirmar el brillo verde metálico, las colonias de los 20 aislados presentaron esta morfología (Figura 2).

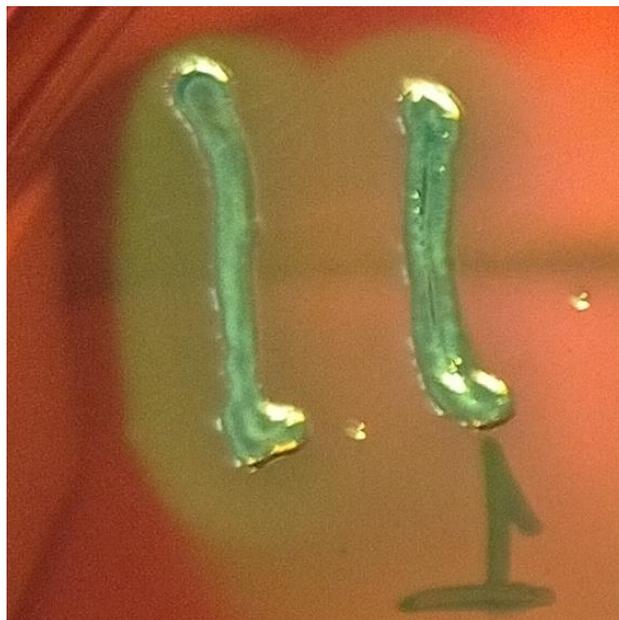


Figura 2. Aislado de *E. coli* en agar EMB, se aprecia el característico brillo verde metálico.

Tabla 4. Pruebas bioquímicas de los 20 aislados presuntivos de *E. coli*.

Aislado	Indol	Rojo de metilo	Voges-Proskauer	Citrato	TSI
Mc1	+	+	-	-	A/AG
Mc2	+	+	-	-	A/AG
Mc3	+	+	-	-	A/AG
Mc4	+	+	-	-	A/A
Mc5	+	+	-	-	A/AG
Mc6	+	+	-	-	A/AG
Mc7	+	+	-	-	A/A
Mc8	+	+	-	-	A/AG
Mc9	+	+	-	-	A/AG
Mc10	+	+	-	-	A/AG
McS1	+	+	-	-	A/AG
McS2	+	+	-	-	ALK/AG
McS3	+	+	-	-	A/AG
McS4	+	+	-	-	A/A
McS5	+	+	-	-	A/AG
McS6	+	+	-	-	A/AG
McS7	+	+	-	-	ALK/AG
McS8	+	+	-	-	A/AG
McS9	+	+	-	-	A/AG
McS10	+	+	-	-	A/A

Sensibilidad antimicrobiana

Se encontró que las 20 cepas presentaron multirresistencia, al presentar resistencia a más de 3 antibióticos (ver anexo 3).

En antibióticos como ampicilina (AM), carbenicilina (CB), cefalotina (CF) y cefotaxima (CFX) los aislados presentaron 100% (20/20) de resistencia. Para el fármaco de nitrofurantoína (NF) las cepas presentaron 90% (18/20) de resistencia, el resto (2/20) fueron intermedias. El 75% (15/20) de los aislados presentaron resistencia para Netilmicina (NET), únicamente el 10% (2/20) de aislados presentaron sensibilidad a este fármaco y el 15% (3/20) fueron intermedios. Las cepas fueron resistentes en un 40% (8/20), intermedias en el 25% (5/20) y sensibles en el 35% (7/20) para el antibiótico de amikacina (AK). El 70% (14/20) de aislados presentaron resistencia frente al antibiótico cloranfenicol (CL) el 25% (5/20) de aislados fueron sensibles y únicamente el 5% (1/20) fue intermedio a dicho antibiótico. En el caso del fármaco sulfametoxazol con trimetoprim (STX) el 40% (8/20) de cepas presentaron resistencia, el 35% (7/20) de cepas fueron intermedias y el 25% (5/20) de cepas presentaron sensibilidad a este antibiótico. Finalmente, las cepas aisladas presentaron mayor sensibilidad a los antibióticos de gentamicina (GE), ciprofloxacino (CPF) y norfloxacino (NOF) con 45% (9/20), 50% (10/20) y 85% (17/20) de cepas sensibles respectivamente. El resto de los aislados (3/20) para NOF fueron intermedios, para GE el 40% (8/20) de aislados fue resistente y únicamente el 5% (1/20) intermedio, en cuanto a CPF el comportamiento de aislados restantes fue de 45% (9/20) intermedio y 5% (1/20) resistentes (Figura 3).

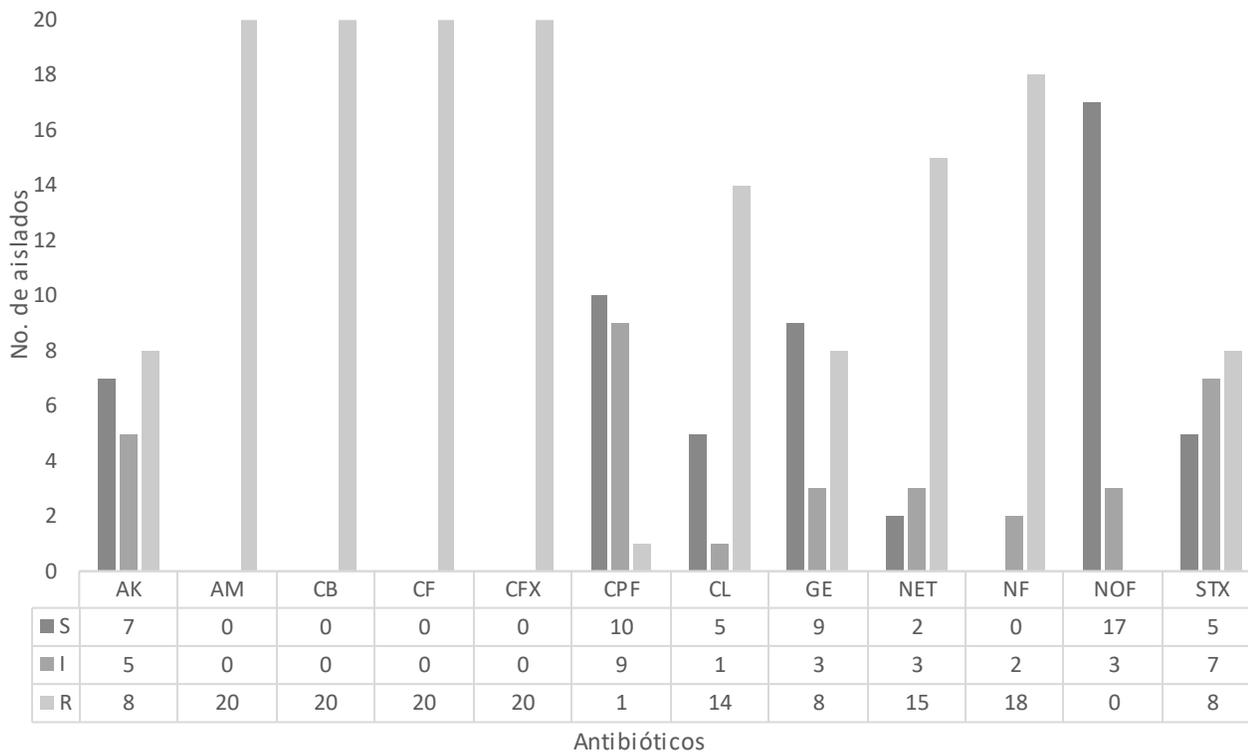


Figura 3. Frecuencia de resistencia y sensibilidad a los antibióticos. S: sensible, I: intermedio, R: resistente; AK: amikacina, AM: ampicilina, CB: carbenicilina, CF: cefalotina, CFX: cefotaxima, CPF: ciprofloxacino, CL: cloranfenicol, GE: gentamicina, NET: netilmicina, NF: nitrofurantoína, NOF: norfloxacino y STX: sulfametoxazol/trimetoprim.

Los antibióticos usados en este estudio pertenecen a 6 familias diferentes: β -lactámicos, aminoglucósidos, fluorquinolonas, fenicoles, nitrofuranos y sulfonamidas potencializadas. Las 20 cepas aisladas resultaron resistentes a 3 o más familias de antibióticos, el 100% de aislados fueron resistentes a los β -lactámicos (AM, CF y CFX), contraste a las fluorquinolonas (CPF y NOF) que presentaron el mayor porcentaje de cepas sensibles, pues 18 aislados presentaron sensibilidad al menos a un compuesto de esta familia y únicamente 1 aislado presentó resistencia a algún compuesto de la familia. En el caso de los aminoglucósidos (AK, CB, GE y NET) los aislados de *E. coli* presentaron mayor actividad de resistencia (64%) que de sensibilidad (22.5%). Para la familia de los nitrofuranos, se utilizó un antibiótico (NF) y ninguna cepa presentó sensibilidad a este fármaco. En las familias de los fenicoles (CL) y sulfonamidas potencializadas

(STX) los aislados presentan una actividad de sensibilidad similar (25%), aunque es baja comparada con la resistencia que presentan los aislados (Figura 4).

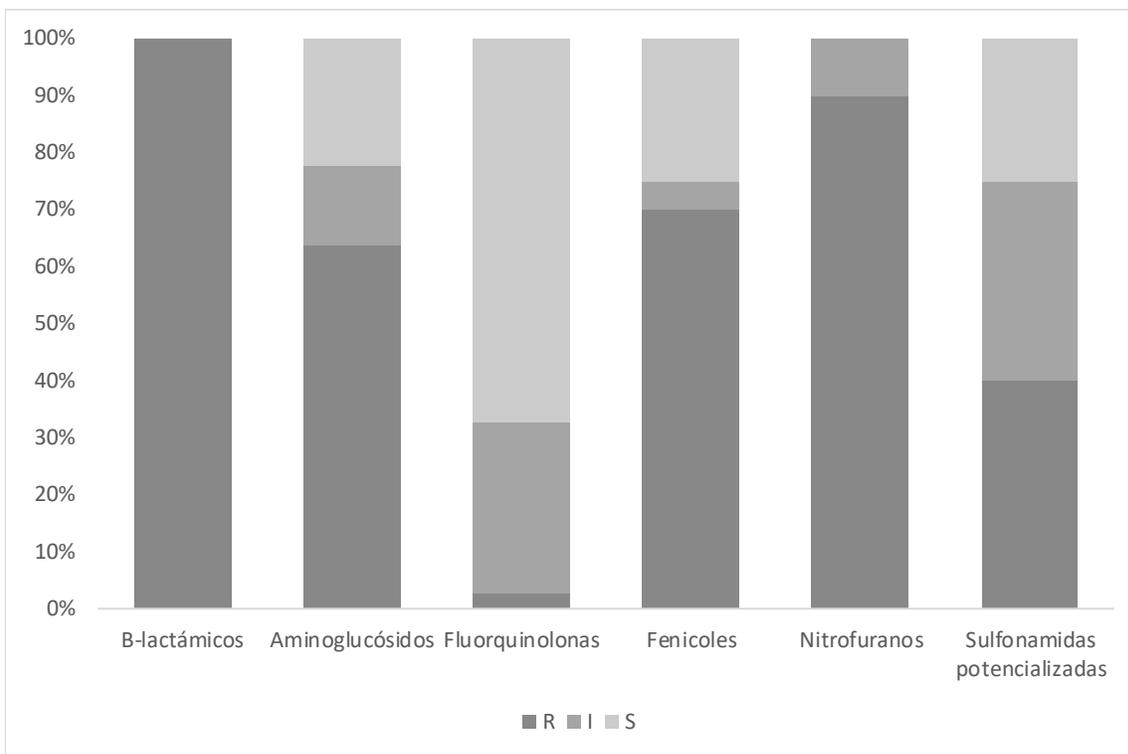


Figura 4. Porcentaje de resistencia y sensibilidad de los aislados a las familias de antibióticos. R: resistente, I: intermedio, S: sensible.

Secuenciación del gen 16S rRNA

La prevalencia para *E. coli* en este estudio fue del 65%, con la comparación de la secuencia obtenida de la amplificación del gen 16S rRNA de los 20 aislados, se encontró que 13 aislados pertenecen a *E. coli*, 8 corresponden a aislados de MacConkey (Mc2, Mc3, Mc5, Mc6, Mc7, Mc8, Mc9 y Mc10) y 5 pertenecen a los aislados de MacConkey con sorbitol (McS2, McS5, McS6, McS7 y McS9). Los 13 aislados presentan porcentaje de similitud > 98% (Stackebrandt & Jonas, 2006), los datos de la búsqueda en Blast se reportan en la Tabla 5.

Los 7 aislados restantes, no pertenecen a *E. coli*, sin embargo, éstas se encuentran dentro de especies de interés en salud pública al ser bacterias que provocan enfermedades en humanos. Tales como *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Aeromonas hydrophila* y *Proteus vulgaris* (Awan *et al.*, 2018; Drzewiecka, 2016; Liu *et al.*, 2018; Ramos-Vivas, 2020)

Tabla 5. Identificación molecular mediante Blast de la secuencia del gen 16S rRNA de los aislados de *E. coli*.

Aislado	Especie	% de identidad	Accession	RID*
Mc2	<i>Escherichia coli</i>	98.34	OQ073501	ZWTKD2AY01R
Mc3	<i>Escherichia coli</i>	99.46	OP740807	ZWU39W5Z013
Mc5	<i>Escherichia coli</i>	99.67	OP986071	ZWU7HBPY01R
Mc6	<i>Escherichia coli</i>	99.06	MN208223	ZWUHSWAN016
Mc7	<i>Escherichia coli</i>	99.93	OP986844	ZWUNVNZ4013
Mc8	<i>Escherichia coli</i>	98.77	MW026012	ZWV4HPXJ013
Mc9	<i>Escherichia coli</i>	99.48	OP363870	ZWV9YJ2T016
Mc10	<i>Escherichia coli</i>	99.41	OP740807	ZWVDGP52013
McS2	<i>Escherichia coli</i>	99.81	OQ344332	ZWVHS0B2013
McS5	<i>Escherichia coli</i>	99.57	MT427668	ZWVPK827016
McS6	<i>Escherichia coli</i>	98.75	KY856932	ZWW6FSTJ013
McS7	<i>Escherichia coli</i>	100	OQ344332	ZWWC29ND013
McS9	<i>Escherichia coli</i>	99.25	MK784807	ZWWHNVTV016

*RID: Request ID

ERIC

Las bandas obtenidas del perfil electroforético resultado de la ERIC-PCR presentaron diferente tamaño, con un rango de peso molecular que va de las 150pb a 2000pb. Las cepas se agruparon con un índice de similitud del 50%, y se revelaron 8 genotipos o cluster, discriminados entre los 13 aislados de *E. coli* (Figura 5), el genotipo P5, P6, P7 y P8 incluyen solo a una cepa, McS9, McS7, Mc9 y McS2 respectivamente; el genotipo P1 y P2 se conformaron por 2 aislados (Mc10 y Mc2, Mc6 y Mc3 respectivamente) con un índice de similitud de 0.75; el cluster P3 se agrupó con un índice de 0.68 e incluye 3 cepas (Mc8, Mc5 y Mc7), de las cuales las cepas Mc8 y Mc5 son la que tienen mayor similitud dentro de todos los aislados (0.79); por último el cluster P4 también está conformado por 2 aislados (McS6 y McS5) y presenta una similitud de 0.7. En este análisis no se encontraron patrones genéticamente idénticos dentro de las cepas aisladas, con lo que se descarta la presencia de clonas.

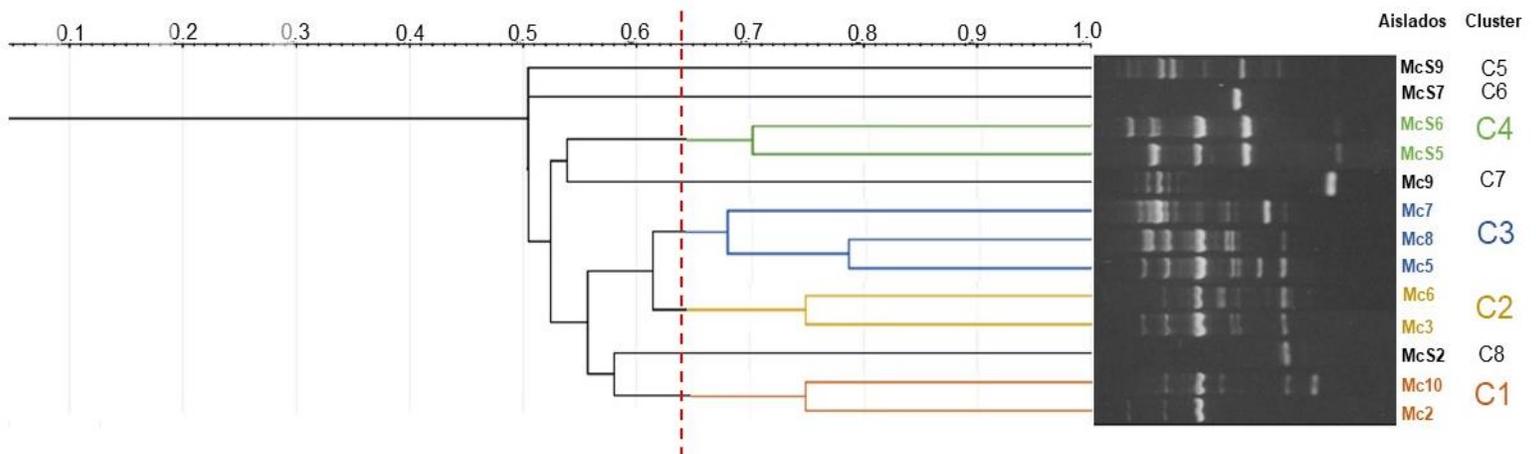


Figura 5. Dendrograma resultado del análisis del patrón de bandas de ERIC-PCR que evidencia la diversidad genética de las 13 cepas de *E. coli* aisladas.

Factores de virulencia

De las 13 cepas de *E. coli* aisladas, ninguna amplificó para el gen *hlyA*, sin embargo, 11 dieron positivos para los genes *stx1* y *stx2*, las correspondientes a Mc3, Mc5, Mc6, Mc7, Mc8, Mc9, Mc10, McS2, McS5, McS7 y McS9, de los cuales 6 también amplificaron para el gen *eaeA* (Figura 6). Las cepas que amplificaron los genes de virulencia *stx1*, *stx2* y *eaeA*, pertenecen al patotipo de las *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) (Tabla 6), lo que indica que en este estudio la prevalencia para las EHEC fue del 55%.

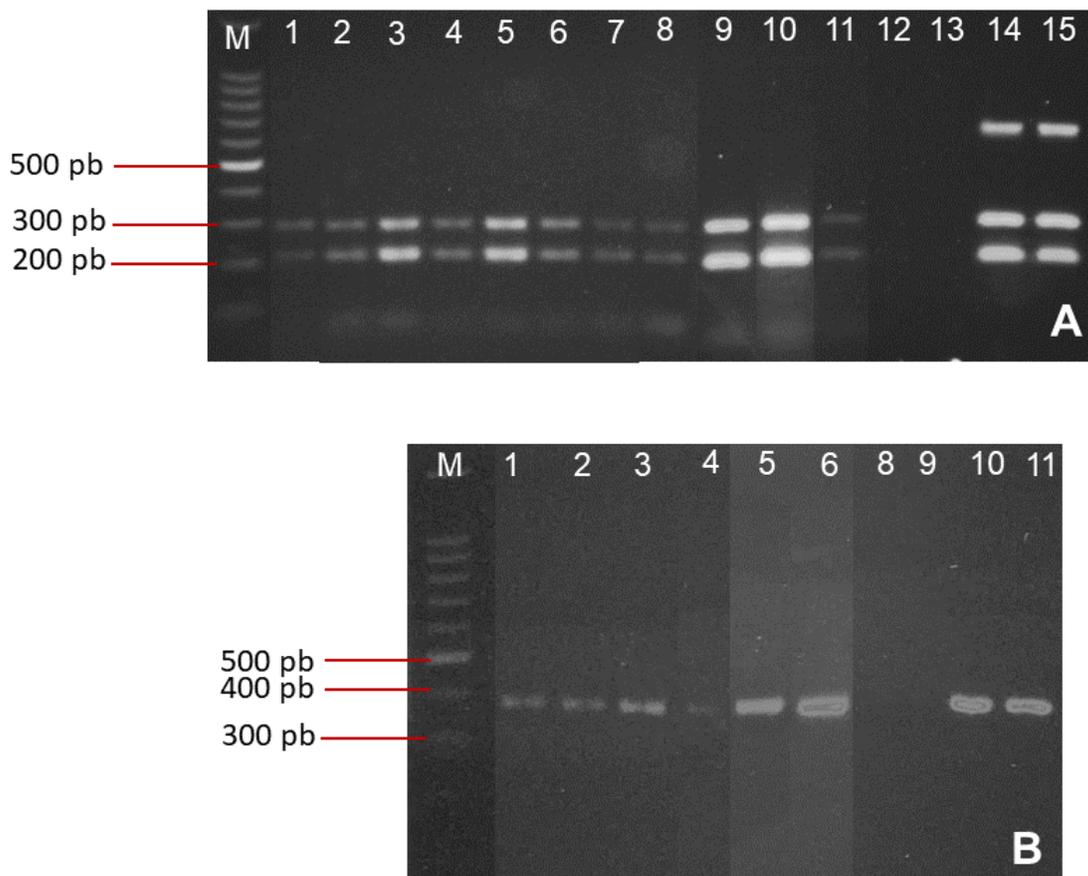


Figura 6. Revelado de la electroforesis en gel de agarosa (1.5%). A) Genes de virulencia *hlyA*, *stx1* y *stx2*, donde: M marcador de peso molecular, pozos 1-11 muestras de *E. coli* positivas a los genes *stx1* y *stx2*, pozos 12-15 controles - y +. B) Gen de virulencia *eaeA*, donde: M marcador de peso molecular, pozos 1-6 muestras de *E. coli*, pozos 8-11 controles - y +.

Tabla 6. Presencia de genes de virulencia e integrón clase 1 en los aislados de *E. coli*.

Aislados	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eaeA</i>	<i>hlyA</i>	<i>IntI-1</i>
Mc 2	-	-	-	-	-
Mc 3	+	+	-	-	+
Mc 5	+	+	-	-	+
Mc 6	+	+	+	-	+
Mc 7	+	+	+	-	+
Mc 8	+	+	+	-	+
Mc 9	+	+	-	-	-
Mc 10	+	+	-	-	-
McS 2	+	+	+	-	-
McS 5	+	+	+	-	-
McS 6	-	-	-	-	-
McS 7	+	+	+	-	-
McS 9	+	+	-	-	+

Integrón

De las 13 cepas aisladas de *E. coli*, 6 cepas (46%) amplificaron ante la presencia de la enzima integrasa clase 1, la banda obtenida presenta un peso molecular de 280pb (Figura 7). Las cepas corresponden a los aislados Mc3, Mc5, Mc6, Mc7, Mc8 y McS9 (Tabla 6). Estas cepas amplificaron también para la región variable del integrón clase 1 (Figura 8). De éstas, las cepas Mc3, Mc7 y McS9 obtuvieron un amplicón con peso molecular de 1500pb, mientras que los aislados Mc5, Mc6 y Mc8 tuvieron una banda de 300 pb.

Resultado de la secuenciación de la región variable, únicamente se identificaron 3 de los 6 aislados (Tabla 7), quienes presentaron la banda con peso molecular de 1500pb, para los otros 3, no se logró identificar el plásmido al que pertenecía la región variable.

El aislado Mc3 presentó el plásmido psh13D178-2, con el esqueleto InCFII y que alberga los genes *mphA*, *bla_{TEM-1}*, *aac(3)-IId*, *dfrA1*, *aadA5* y *sul1* (Qiu *et al.*, 2022). La cepa Mc7 presentó el plásmido pLSB54-mcr-1, que presenta los genes *bla_{CTX-M-14}*, *oqxA*, *oqxB*, *fosA3*, *floR*, *cmiA1*, *sul1*, *sul2*, *sul3* y *dfr12* (Mao *et al.*, 2018). Y en el aislado McS9 se encontró el plásmido pKL00221_2, que codifica para los genes: *aac(6')-Ib*, *aada2*, *aph(3')-1a*, *bla_{KPC-2}*, *bla_{OXA-9}*, *bla_{TEM-1A}*, *catA1*, *dfrA12*, *mph(A)*, *sul1* (Evans *et al.*, 2020).

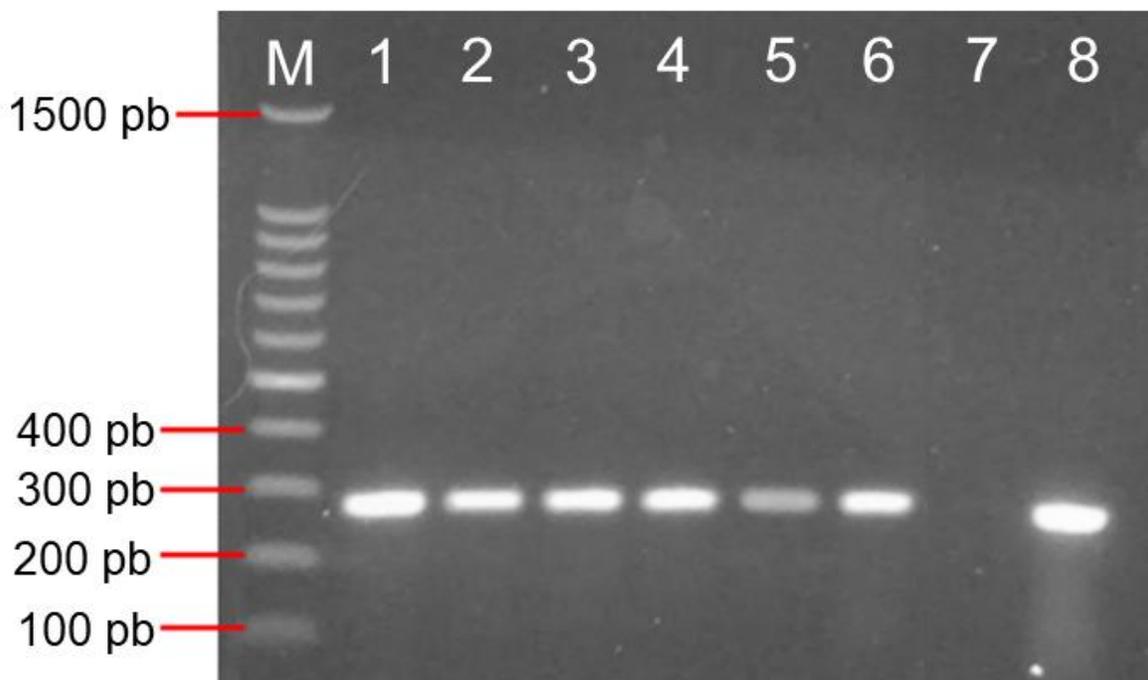


Figura 7. Revelado de la electroforesis en gel de agarosa (1.5%). M marcador de peso molecular, pozos 1-6 aislados de *E. coli* positivos para el gen de la integrasa. Pozos 7 control – y pozo 8 control +.

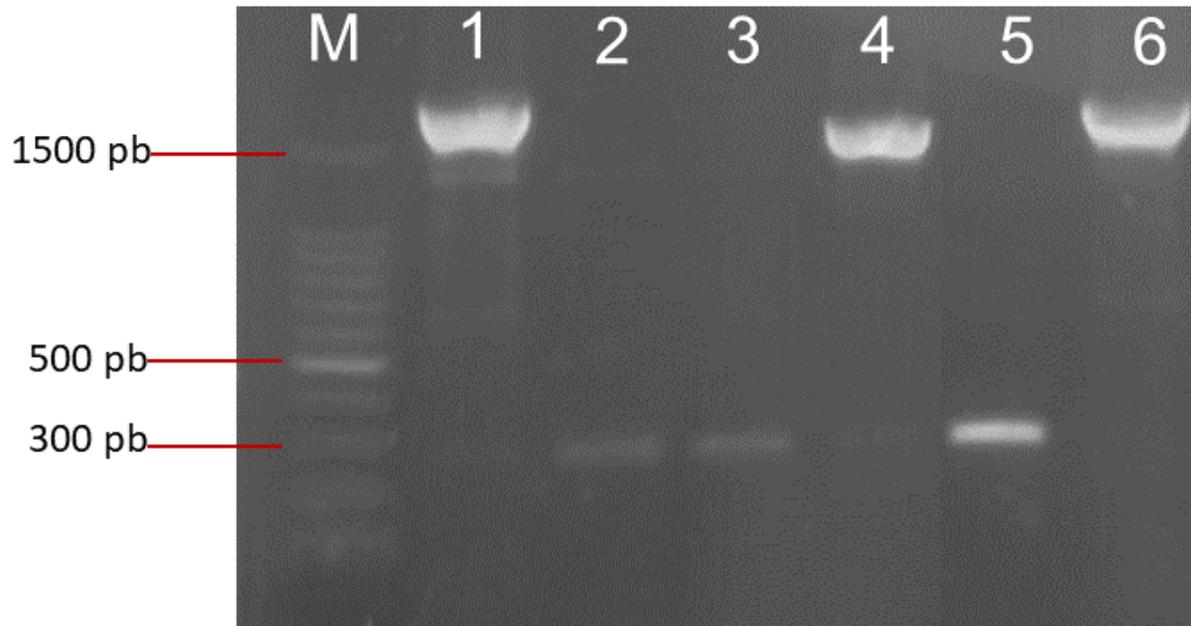


Figura 8. Revelado de la electroforesis en gel de agarosa (1.5%). M marcador de peso molecular, pozos 1-6 amplicón de la región variable del integrón clase 1.

Tabla 7. Identificación molecular de plásmidos mediante Blast de la región variable del integrón clase 1 en los aislados de *E. coli*.

Aislado	Plásmido	% de identidad	Accession	RID*
Mc3	psh13D178-2	98.05	ON461900	ZZ1DZYU2013
Mc7	pLSB54-mcr-1	97.84	MG773376	ZZ2MFJ3U013
McS9	pKLP00221_2	97.70	OP378664	ZZ48Y99M013

*RID: Request ID

Análisis de componentes principales

En la Figura 9 se muestra el dendrograma resultado del agrupamiento jerárquico por clustering clásico de los aislados de *E. coli*, considerando la sensibilidad o resistencia antimicrobiana y la presencia o ausencia de genes de virulencia. En la Figura 10 se muestra el mismo agrupamiento de los aislados, agregando el agrupamiento de las variables descriptivas (antibióticos y genes de virulencia), se visualiza la frecuencia de ocurrencia. Para los antibióticos el color rojo indica la resistencia que presentaron los aislados al antibiótico, el tono amarillo los que fueron intermedios, y el azul claro indica la sensibilidad; en cuanto a los genes de virulencia el color azul claro indica presencia del gen en el aislado, mientras que el azul rey hace referencia a la ausencia del gen. Los antibióticos AM, CB, CF, CFX y NF tienen la misma similitud pues presentaron resistencia en todos los aislados de *E. coli*, los genes *stx1* y *stx2* también presentan la misma similitud, al tener la misma frecuencia, en esta imagen se logra observar el comportamiento de los aislados frente a las variables y el agrupamiento derivado de la similitud de este comportamiento, por ejemplo, los aislados McS6 y Mc2 que están agrupados juntos, son los únicos dos aislados que no fueron positivos ante la presencia de ningún gen de virulencia.

En el APC se formaron 12 componentes principales (CP) y 3 grupos, en la Tabla 8 se muestra el eigenvalue y el porcentaje de la varianza que presenta cada componente. El CP1 presenta eigenvalue de 1.78 (41.63% de la varianza) y el CP2 tiene un eigenvalue de 0.93 (21.73% de la varianza), juntos representan el 63.36% de la varianza acumulada; con el CP3 se alcanza el 77.89% de la varianza. El scatter plot (Figura 11) muestra el ordenamiento de los aislados de *E. coli* y las variables (antibióticos y genes de virulencia), las elipses representan un intervalo de confianza del 95%. Los vectores más largos como NET, STX, GE, AK y CL explican más variabilidad, y los aislados más cercanos a cada variable indican más relación con ella. Los grupos o cluster asignados fueron 3 (Figura 11), de ellos los grupos 2 y 3 presentan diferencia estadística significativa con valor de $p < 0.05$. El grupo 1 está

conformado por un solo aislado (McS6) ubicado en el tercer cuadrante y fuera de las elipses, este aislado es el más distante del resto de aislados debido a que presenta mayor sensibilidad antimicrobiana, pues es sensible a 6 antibióticos y no posee ninguno de los 4 genes de virulencia evaluados en este estudio. En el segundo cuadrante se ubica el grupo 2, formado por los aislados Mc5, McS2 y McS7 que presentaron sensibilidad a 4 antibióticos y la presencia de 2 y 3 genes de virulencia. El grupo 3, formado por el resto de aislados, se concentran en el primer cuadrante y algunos aislados se ubican en el cuarto cuadrante, se caracterizan por presentar sensibilidad únicamente a 2 antibióticos (a excepción del aislado Mc8, que presenta sensibilidad solo a 1 antibiótico) y por presentar 2 o 3 genes de virulencia, además de ser el grupo con mayor resistencia a antibióticos.

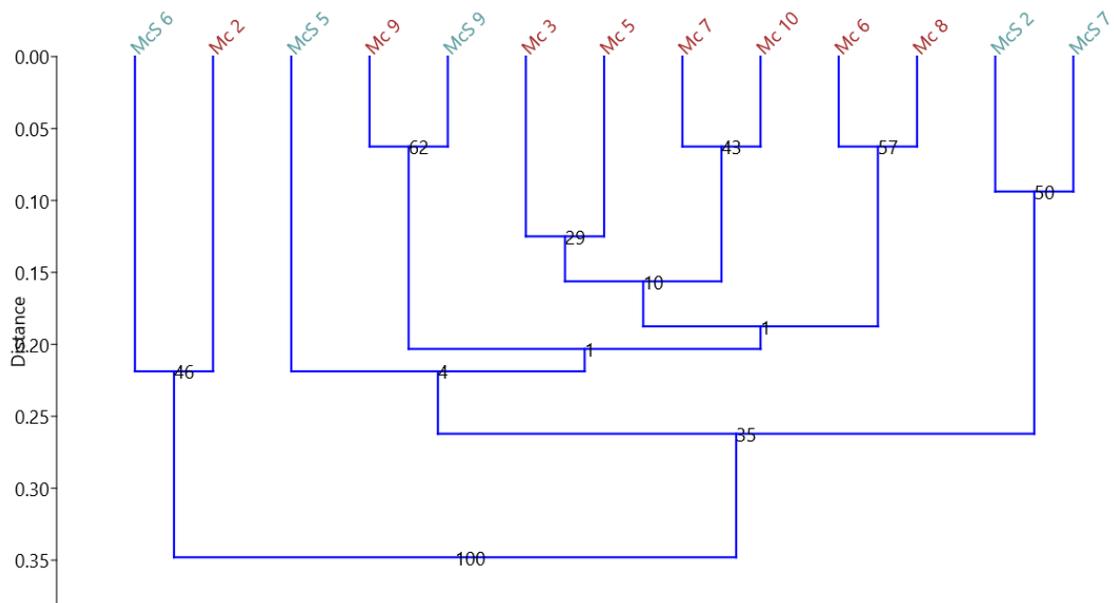


Figura 9. Agrupamiento jerárquico por clustering clásico de los aislados de *E. coli* basado en la resistencia o sensibilidad frente a los antibióticos y la presencia o ausencia de los factores de virulencia.

Número en los nodos: porcentaje de réplicas donde cada nodo resulta compatible en un bootstrapping de 1000 réplicas.

Tabla 8. Componentes del ACP con su eigenvalue y el % de la varianza.

CP	Eigenvalue	% varianza
1	1.78262	41.63
2	0.930493	21.73
3	0.622172	14.53
4	0.337151	7.8736
5	0.282386	6.5947
6	0.174398	4.0728
7	0.079935	1.8667
8	0.0511704	1.195
9	0.0217257	0.5737
10	2.25249E-32	5.2603E-31
11	7.84468E-33	1.832E-31
12	4.78471E-34	1.1174E-32

Presencia a de *Escherichia coli* enteropatógena en carne molida obtenida en punto de venta del municipio de Huasca de Ocampo, Hidalgo

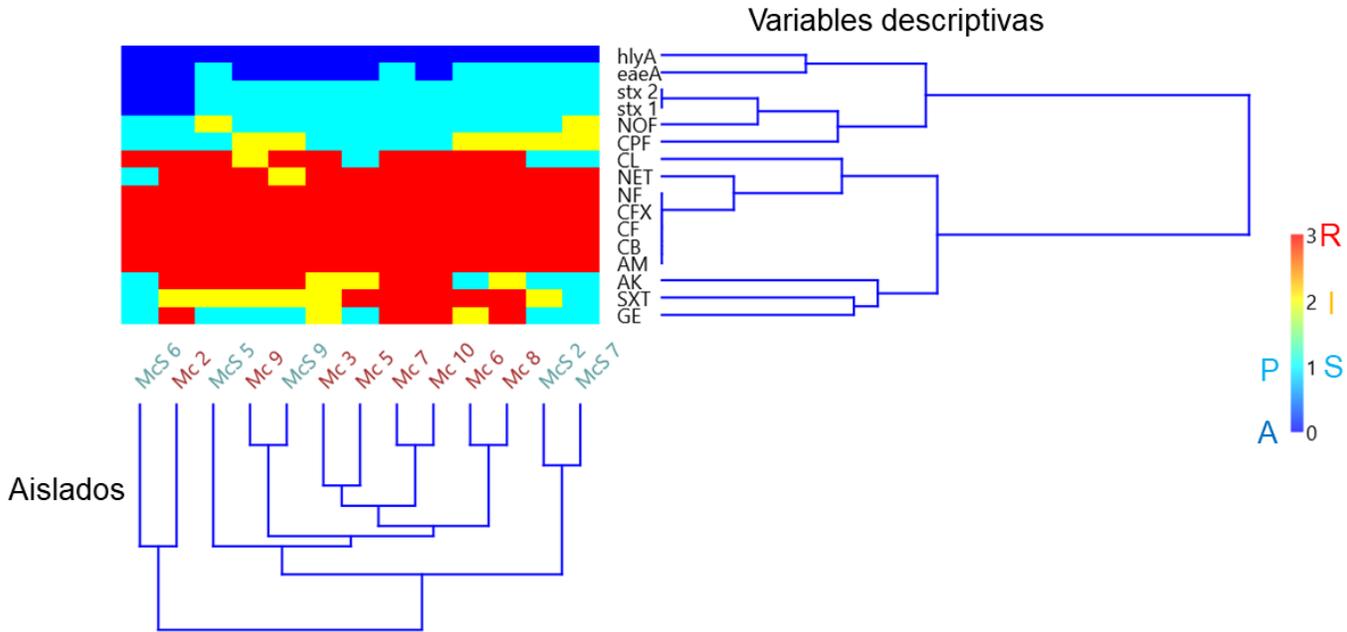


Figura 10. Agrupamiento bidireccional por emparejamiento de grupos. Se muestra el agrupamiento de los aislados de *E. coli* y el agrupamiento de las variables descriptivas (antibióticos y genes de virulencia).
R: resistente, I: intermedio, S: sensible, P: presencia, A: ausencia.

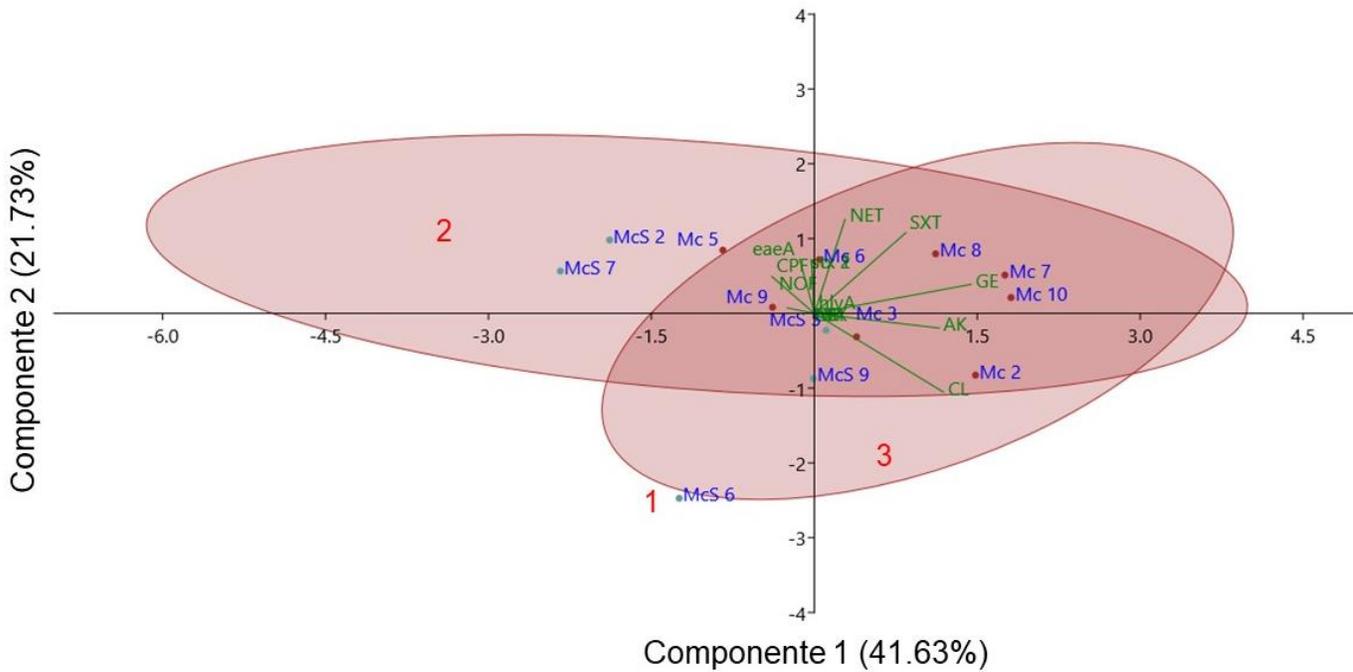


Figura 11. ACP, scatter plot del ordenamiento de los aislados de *E. coli* respecto a las variables descriptivas (antibióticos y genes de virulencia).
Las elipses representan un intervalo de confianza del 95%.

VIII. Discusión

La carne de res por sí misma es un alimento altamente perecedero, derivado del elevado contenido de agua y nutrientes que favorecen el crecimiento de diversos microorganismos. Sumando el proceso de molido que permite la penetración al tejido muscular de patógenos de la superficie de la carne, incrementando así el riesgo de contaminación de la carne molida y de brotes de ETAs (Galván *et al.*, 2011).

Como se mencionó, de los 20 aislados 13 resultaron *E. coli* y 7 pertenecen a especies como: *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Aeromonas hydrophyla* y *Proteus vulgaris*. La identificación de la especie se realizó mediante la comparación de la secuencia del gen 16S rRNA con la base de datos en GeneBank. Estas especies también son de interés en salud pública por causar enfermedades en humanos, aunado a la multirresistencia que presentaron. La confusión en el aislamiento de las cepas se pudo dar por diferentes circunstancias ya que comparten ciertas características con *E. coli*, a pesar de que no todas pertenecen a la misma familia, todas son bacilos Gram negativos, por lo que, con la tinción no se pudieron descartar estas cepas. Las especies de *H. alvei*, *C. freundii* y *C. koseri* pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, al igual que *E. coli*. La especie *H. alvei* suele crecer en medios de cultivo para aislamiento de enterobacterias, en algunos casos, la bacteria supera ampliamente el número de unidades formadoras de colonias respecto a otros patógenos buscados habitualmente en estos medios, como *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. o *E. coli* (Ramos-Vivas, 2020). Las colonias de *C. freundii* y *C. koseri* presentan morfología similar a las de *E. coli* (Frederiksen, 2015). Si bien es cierto que el resultado de las pruebas bioquímicas son diferentes, Frederiksen (2015) publicó una tabla con las diferentes pruebas bioquímicas aplicadas a enterobacterias, reportando el porcentaje de reacciones positivas, no en todos los casos se reportó el 100% o 0%, por ejemplo, para *C. freundii* y *C. koseri* se reportó: producción de indol 33 y 99%, rojo de metilo 100% para ambas especies, Voges-Proskauer 0% para ambas especies, citrato 78 y 99%, capacidad para

fermentar lactosa 78 y 50%, y sorbitol 100 y 99%, estos datos arrojan información de que no todas las cepas de la misma especie se comportan igual y llegan a dar resultados diferentes a los esperados en las pruebas bioquímicas, como ocurrió en este estudio que se aislaron especies diferentes a las de interés, a pesar de realizar las pruebas bioquímicas reportadas en la literatura, en la Tabla 9 se muestra el resultado de las pruebas bioquímicas en las diferentes especies aisladas en el presente estudio.

Las otras dos especies aisladas *A. hydrophila* y *P. vulgaris* no pertenecen a las enterobacterias, *P. vulgaris* pertenecía a las enterobacterias hasta 2016, año en el que Adeolu *et al* propusieron una nueva familia *Morganellaceae*, basada en análisis genómicos, sin embargo, *P. vulgaris* se ajusta a la definición de las enterobacterias y comparte características con *E. coli* (Penner, 2015). En cuanto a la especie *A. hydrophila* pertenece a la familia *Aeromonadaceae* y uno de sus hábitats son los animales de sangra caliente, se encuentra relacionada con enfermedades extraintestinales y diarreicas en humanos (Martin-Carnahan & Joseph, 2015). Crece perfectamente en agar sangre y MacConkey, también son capaces de fermentar carbohidratos (Aguilar-García, 2015). A pesar de que en la literatura se reportan las pruebas bioquímicas como positivas o negativas, no todas las cepas reaccionan igual, Martin-Carnahan & Joseph (2015) reportan las pruebas bioquímicas para el género de *Aeromonas* como positivas aquellas que presentan >90%, negativas aquellas con <10% (Tabla 8), en todas las pruebas bioquímicas existe la posibilidad de que un aislado no se comporte como la mayoría de la especie que se busca, lo que causa el aislamiento de cepas diferentes. El uso de métodos convencionales para la identificación de bacterias sirven como guía y son muy útiles en el diagnóstico clínico, sin embargo, es de suma importancia el uso de pruebas moleculares para tipificar e identificar correctamente a las cepas de interés, y así disminuir el error que se da solo utilizando los métodos convencionales.

Tabla 9. Pruebas bioquímicas de las especies aisladas en el presente estudio.

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Aeromonas hydrophyla</i>
Producción indol	+	-	d	+	+	+
Rojo de metilo	+	d	+	+	+	+
Voges-Proskauer	-	d	-	-	-	+
Citrato	-	-	d	+	d	d
Ácido Sulfhídrico	-	-	d	-	+	-

Símbolos: + >90%; - <10%; d 11 - 89% positivo con incubación a 35° C.
Adaptado de Frederiksen (2015); Martin-Carnahan & Joseph (2015).

E. coli es un microorganismo de relevancia en salud pública, por tener diversos patotipos causales de diversas enfermedades diarreicas principalmente (Blount, 2015). La vía de exposición más común a este patógeno es el consumo de alimentos contaminados con este agente etiológico, tal como lo es la carne molida cruda o insuficientemente cocida (Chien *et al.*, 2016; FAO, 2011).

De las 10 muestras analizadas en el presente estudio, 8 resultaron contaminadas con *E. coli*, y la prevalencia de *E. coli* patógena fue del 55% que pertenecen al patotipo de las *E. coli* enterohemorrágicas, también conocidas como *E. coli* productoras de la toxina shiga (Di Pillo & Sotomayor, 2018; Farfán-García *et al.*, 2016; Nobili *et al.*, 2017). Este patotipo, se caracteriza por causar infecciones clínicas cuyos síntomas van de diarreas leves y sanguinolentas, a manifestaciones graves como colitis hemorrágica, púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) y el síndrome urémico hemolítico (SUH), éste puede llegar a ser mortal, provoca insuficiencia renal y es considerado la causa principal de insuficiencia renal en infantes (FAO/WHO, 2011; Gomes *et al.*, 2016; Pigüave *et al.*, 2019).

El reservorio principal de EHEC son los rumiantes, en especial el ganado bovino, considerados como súper-propagadores, pues son responsables de la liberación de más del 95% de estos microorganismos al ambiente, lo que propicia la contaminación de la carne y brotes de enfermedades diarreicas (Blount, 2015; FAO/WHO, 2011; Nobili *et al.*, 2017), de ahí la importancia de analizar la carne molida comercializada en el municipio de Huasca de Ocampo, Hidalgo ya que no existen reportes previos al presente estudio. Según datos de la Encuesta Nacional de Salud (ENSANUT) en 2021 se reportó una prevalencia para la enfermedad diarreica aguda (EDA) en niños menores de 5 años en México del 11.8% y para el estado de Hidalgo del 7%. Y por sexo, se estimó una prevalencia de EDA a nivel nacional del 12.4% para hombres y 11.2% para mujeres, para el estado de Hidalgo fue de 14.3% en hombres y 12.9% en mujeres (Menchaca-Armenta & Gutiérrez-Jaimes, 2022). Ahora bien, según datos reportados en el informe semanal de vigilancia epidemiológica para de EDA's en menores de 5 años, en la semana 34 del 2023, se reportó una incidencia de 0.7 para el estado de Hidalgo (DGE, 2023), sin embargo, no se especifican los municipios que presentan mayor incidencia, además de que, tampoco se puede determinar la etiología de la EDA, pues el 94% se reportan como ocasionadas por otros organismos y como mal definidas (Olaiz-Fernández *et al.*, 2020).

El grupo de *E. coli* enterohemorrágicas son productoras de toxinas shiga (*stx1* y *stx2*), que ataca los vasos sanguíneos pequeños y mata a las células intestinales (Blount, 2015). Incluye más de 100 serotipos, el más importante es el O157:H7, y los otros serotipos son denominados no-O157 que incluyen a O23, O26, O45, O91, O103, O104, O111, O113, O117, O118, O121, O128 y O145 (FAO/WHO, 2011; Rípodas-Navarro *et al.*, 2017). En el presente estudio no se realizó el serotipado de los aislados, pero por definición las STEC deben producir al menos una de las dos toxinas shiga, por eso los aislados obtenidos de *E. coli* se pueden clasificar dentro de este grupo, al dar positivo a ambas toxinas.

La prevalencia de *E. coli* en carne molida es variable alrededor del mundo, Cardona-López *et al* (2020) realizaron un estudio de los patotipos de *E. coli* presentes en carne molida en Guadalajara, de las 100 muestras colectadas, solo 15 presentaron contaminación por algún serotipo de *E. coli* diarreogénicas, sin embargo, no encontraron EHEC, contraste al presente estudio que, de las 10 muestras analizadas, 8 resultaron contaminadas con EHEC. En otro estudio, realizado por Nobili *et al* (2017) de 250 muestras de carne cruda de res proveniente de Apulia en Italia, únicamente 5 presentaron contaminación por EHEC, de éstas, 2 fueron positivas para *stx1* y 3 para *stx2*, ninguna fue positiva para el gen *eaeA*, y tampoco hubo cepas que presentaran ambas toxinas shiga. Rípodas-Navarro *et al* (2017) reportaron prevalencia del 25.45% de STEC en preparados cárnicos, porcentaje mucho menor al encontrado en este estudio (55%). Otro caso contrastante a los datos del presente estudio son los datos reportados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2014), donde se analizaron 2522 muestras de carne y derivados cárnicos vacunos por 13 estados miembros y Suiza, resultado, sólo el 3% fueron positivas para EHEC. Los resultados en todos los estudios, reporta una prevalencia inferior a la encontrada en el presente, estos resultados evidencian problemática en la gestión del proceso a lo largo de la producción y distribución de la carne analizada. En un reporte de la FAO y la OMS (2011) mencionan que no cuentan con la información necesaria para saber hasta qué punto EHEC puede considerarse omnipresente en el ganado, y cuáles son las razones de la naturaleza esporádica de EHEC y la variación en prevalencia en bovinos en diferentes regiones del mundo. Sin embargo, es importante recordar que la contaminación de la carne se puede dar en cualquier etapa de la cadena de producción de ésta; desde el matadero hasta el consumo de la carne, se encuentran diferentes medios de contacto que propician la contaminación de *E. coli* y demás agentes etiológicos. La variación en la prevalencia de *E. coli* patógena en muestras de carne molida puede ser atribuida a las diferencias en normas sanitarias de la carne y en el manejo higiénico de la carne desde el matadero hasta los establecimientos minoristas, bajos estándares y malas prácticas higiénicas fomentan la contaminación cruzada de la carne por *E. coli* (Abayneh *et al.*, 2019).

Además, en México no existe un modelo de diagnóstico para enfermedades diarreicas provocadas por EHEC o cualquier otro patotipo de *E. coli*, mucho menos un seguimiento, el manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de la enfermedad diarreica aguda se centra en los agentes etiológicos *Vibrio cholerae*, *Shigella* spp, *Salmonella* spp y rotavirus (DGE, 2022) por lo que existe una alta probabilidad de que haya un mal diagnóstico y no se busque a otros agentes causales de diarreas como EHEC.

El gen *stx2* es el más relevante clínicamente, pues está asociado a mayor probabilidad de desarrollar el SUH en infecciones por cepas que solo presentan este gen a las que presentan el gen *stx1* o ambos (Nobili *et al.*, 2017). También, se ha reportado que la combinación de los genes *stx2/eaeA* se relaciona a la manifestación de signología más grave en pacientes que cursan las infecciones gastrointestinales (Boerlin *et al.*, 1999; Di Pillo & Sotomayor, 2018; Sánchez *et al.*, 2006; Sharafa & Shabanaa, 2016), lo que cobra relevancia ya que 6 de los aislados de *E. coli* presentan esta combinación de genes y que suponen un riesgo para la salud.

La identificación de las cepas aisladas a partir del análisis de la secuencia del 16S rRNA permitió separar los aislados que pertenecen a *E. coli* de los que no pertenecen a esta especie, obteniendo de los 20 aislados 13 de la especie *E. coli*. La secuencia del gen 16S rRNA es uno de los estándares de oro en la taxonomía bacteriana y como método de identificación, pues logra desentrañar relaciones más distantes entre cepas (Stackebrandt & Jonas, 2006) y cuenta con otras características, tales como su tamaño (1500pb) que es lo suficientemente grande para brindar información, además la función de este gen no ha cambiado, lo que sugiere que los cambios de secuencia aleatorios son una medida más precisa del tiempo (Suardana, 2014). El uso de la secuenciación del gen 16S rRNA ha ido tomando relevancia como método de identificación rápida y precisa de agentes infecciosos, lo que ayuda en la práctica clínica y vigilancia de la salud pública, existen bases de datos que incluyen secuencias casi completas del 16S rRNA de

numerosas cepas y sus ubicaciones taxonómicas, que permiten la comparación de secuencias desconocidas (Srinivasan *et al.*, 2015). Algunos estudios se han enfocado en el uso del gen 16S rRNA para la identificación de patógenos bacterianos como *E. coli*, por ejemplo, Garbaj *et al* (2016) analizaron 108 muestras de leche cruda logrando identificar 11 cepas pertenecientes a *E. coli* O157:H7 por secuenciación parcial de 16S rRNA. En otro estudio, realizado por Tan & Soon (2016), se analizaron muestras de agua de 17 máquinas expendedoras de agua, confirmando la presencia de *E. coli* y *E. coli* O157:H7 por la secuenciación del 16S rRNA; en dicho estudio se obtuvieron bandas de peso molecular de 1500pb para cada cepa, que corresponde al peso reportado para este gen, en el presente estudio, los aislados también presentaron bandas de 1500pb, lo que indica que el fragmento de DNA se amplificó correctamente. Srinivasan *et al* (2015) hicieron uso del gen 16S rRNA para la identificación de 617 aislamientos, que incluyen a una elevada gama de patógenos bacterianos clínicamente relevantes y que abarcan 30 identidades clínicas a nivel de especie, con múltiples cocos Gram positivos y Gram negativos, bacilos Gram negativos y el bacilo Gram positivo *M. tuberculosis*, lo que indica la funcionalidad de la secuencia del gen 16S como método de identificación para cualquier tipo de bacteria.

La técnica ERIC-PCR permitió determinar la diversidad genética entre estas cepas analizadas y los patrones de bandeo obtenidos, que revelaron alta variedad genética entre los aislados de *E. coli*, pues no se encontraron clonas y se revelaron 8 cluster. Datos similares a los obtenidos por López-Ramírez *et al* (2018) donde encontraron 12 patrones clonales en 20 aislados de *E. coli* de pacientes con infección urinaria, en ese estudio si hubo presencia de clonas. Ranjbar *et al* (2017) analizaron el perfil de ERIC-PCR de 120 cepas de *E. coli* provenientes de heces de animales, el estudio reveló 10 genotipos ERIC-PCR de *E. coli* sin el avistamiento de clonas. En otro estudio, realizado por Sekhar *et al* (2017), encontraron 11 genotipos discriminados de 12 aislados de *E. coli* provenientes de muestras de heces de aves, y tampoco avistaron clonas en las cepas. Resulta evidente la variabilidad genética que existe dentro de las *E. coli*, esta variabilidad se asocia a diferentes procesos,

tales como, la dispersión de la cepa, la recombinación genética y la transferencia horizontal de los genes (Chattopadhyay & Sokurenko, 2013).

La obtención de las secuencias ERIC es útil para investigaciones epidemiológicas, permite tipificar bacterias entéricas, para la detección de brotes (Bakhshi *et al.*, 2018) y es eficaz en la genotipificación de diferentes cepas de *E. coli*, al ser una herramienta de huellas dactilares genómicas sensible y altamente discriminatoria entre las cepas de estudio, aunado a su buena reproducibilidad, bajo costo y rapidez (Sekhar *et al.*, 2017). Soltani *et al* (2012), lograron identificar 65 cepas diferentes de 95 muestras, con bandas de 232 pb a 2690 pb; en el presente estudio se aislaron 13 cepas diferentes con bandas que presentan un tamaño de entre 150pb y 2000pb. Los genotipos que arroja la técnica ERIC-PCR presentan poder discriminatorio mayor en la caracterización de la diversidad genética dentro de las cepas al que se obtiene del análisis del gen 16S rRNA (Sekhar *et al.*, 2017).

Los 20 aislados que se obtuvieron en este estudio presentaron multirresistencia, tema que es de relevancia en salud pública por las complicaciones en el tratamiento clínico que se presenta en humanos con enfermedades causadas por estos microorganismos. Las consecuencias de infecciones por bacterias multirresistentes van de enfermedades más largas, alza en la mortalidad, estancias prolongadas en los hospitales, incremento en costos en el tratamiento hasta una baja en el derrame económico derivado de la disminución en la productividad de animales y humanos enfermos (OMS, 2016). En este estudio se determinó la sensibilidad a 12 antibióticos dentro de 6 familias, ningún antibiótico presentó 100% de sensibilidad en los aislados, la familia en la que se observó mayor sensibilidad fue en las quinolonas (67.5%), en especial el fármaco NOF; contraste a los β -lactámicos que presentaron 100% de cepas resistentes y los nitrofuranos en los que se observó resistencia en el 90% de los aislados y 10% intermedios; el resto de familias, que incluye a los aminoglucósidos, fenicoles y sulfonamidas potencializadas presentan actividad de sensibilidad similar, 22.5, 25 y 25% respectivamente, aunque sigue siendo un porcentaje muy bajo, comparado con la

resistencia observada. El estudio de bacterias multirresistentes ha tomado fuerza en diferentes regiones del mundo (Tabla 10) por ejemplo, Abayneh *et al* (2019) realizaron un estudio en la ciudad de Jimma, Etiopía, aislaron 35 cepas de *E. coli* de carne molida proveniente de establecimientos minoristas, obteniendo 26 cepas (71.3%) que presentaron multirresistencia, con resistencia a las clases de antibióticos como los β -lactámicos, tetraciclina, sulfonamidas potencializadas y eritromicina. Los medicamentos con menor resistencia fueron gentamicina, neomicina y ciprofloxacino; en el fármaco de amikacina se observó sensibilidad en todas las cepas. En otro estudio realizado en la ciudad de Huancavelica, Perú, se aislaron 320 cepas de *E. coli*, las cuales presentaron resistencia a gentamicina, novomicina, tetraciclina, ampicilina y penicilina, y tuvieron sensibilidad a los antibióticos de enrofloxacina, amikacina y ceftriaxona (Carhuapoma *et al.*, 2020). Ruiz-Roldán *et al* (2018) evaluaron la sensibilidad antimicrobiana de 25 aislados de carne de origen vacuno, de los cuales 52% presentó resistencia a tetraciclina, 48% a ciprofloxacino y 44% a ampicilina, de las 25 únicamente el 27% presentó multirresistencia, contraste a este estudio que el 100% de los aislados fueron multirresistentes. En otro estudio, realizado por Carvajal *et al* (2019) en la ciudad de Lebrija, Colombia, aislaron 46 cepas de *E. coli*, las cepas fueron resistentes a más de tres antibióticos, en el 91% se observó resistencia a antibióticos betalactámicos, 70% de los aislados presentaron resistencia sulfonamidas, el 54% a las fluorquinolonas y 43% a los aminoglucósidos. En México y Estados Unidos también han reportado aislamientos de *E. coli* con multirresistencia, en una evaluación de muestras de leche con mastitis realizado por Jiménez *et al* (2017) en Michoacán, se aislaron 34 cepas de *E. coli* multirresistentes, donde los compuestos a los cuales mostraron mayores índices de resistencia fueron a tetraciclina (88.2%), ampicilina (76.5%) y cefalotina (73.5%); además, se observó resistencia intermedia principalmente para cefotaxima (64.7%), nitrofurantoína (52.9%) y ceftriaxona (47%). En otro estudio realizado en la ciudad de Chihuahua se aislaron 29 cepas de *E. coli*, aisladas de muestras clínicas de la cuales 23 presentaron multirresistencia y 6 no fueron clasificadas en este grupo (Camacho-Silvas *et al.*, 2021). Liu *et al* (2016) analizaron 68 aislados de *E. coli* multirresistentes, provenientes de perros y

gatos en Estados Unidos, de los cuales 97,1% de los aislamientos fueron resistentes a fármacos β -lactámicos, fluorquinolonas y tetraciclinas. En otro estudio se obtuvieron muestras de moluscos bivalvos recolectados de la Bahía de Chesapeake, Maryland en Estados Unidos, se obtuvieron aislados de *E. coli*, en los cuales la resistencia se observó con mayor frecuencia en cefalotina (90.2%), nitrofurantóina (43,9%) y ampicilina (22%) (Miotto *et al.*, 2019). En la mayoría de estudios se revela la elevada tasa de resistencia que presenta *E. coli* a compuestos β -lactámicos, aminoglucósidos y tetraciclinas, pues son las familias que mayor porcentaje de resistencia se reporta. La resistencia a los antibióticos indica que éstos tuvieron alguna modificación en su mecanismo de acción, a través de la impermeabilidad de la pared celular, la inactivación enzimática, modificación del sitio diana, o la expulsión del fármaco por mecanismos que tiene la bacteria (Carhuapoma *et al.*, 2020; Chávez-Jacobo, 2020; Kojima & Nikaido, 2013; Pérez-Cano & Robles-Contreras, 2013; Reygaert, 2018).

Tabla 10. Comparación de las familias de antibióticos evaluados en diferentes estudios.

	Este estudio	Abayneh <i>et al.</i> , 2019	Carhuapoma <i>et al.</i> , 2020	Ruiz-Roldán <i>et al.</i> , 2018	Carvajal <i>et al.</i> , 2019	Jiménez <i>et al.</i> , 2017	Liu <i>et al.</i> , 2016	Miotto <i>et al.</i> , 2019
β -lactámicos	100	50	44	30	91	35.2	75.3	27.6
Fluorquinolonas	2.4	11.4	48	8	54	5.9	86.7	1.6
Nitrofuranos	90	---	---	4	---	35.3	---	43.9
Aminoglucósidos	64	3.8	66	---	43	15.8	30.8	1.2
Fenicoles	70	---	---	4	---	11.8	44.1	0
Sulfonamidas potencializadas	40	54.3	---	12	70	2.9	50	0
Tetraciclinas	---	54.3	52	52	---	88.2	88.2	0
Macrólidos	---	100	---	8	---	---	---	---

% de resistencia.

--- antibióticos no evaluados.

Una mayor exposición a los antibióticos incrementa la posibilidad de que pierda eficacia y el microorganismo se haga resistente a dicho fármaco, por eso el uso indiscriminado de antibióticos es la causa principal del surgimiento de bacterias resistente (Aslam *et al.*, 2023). El uso no solo se restringe en humanos (profilaxis y tratamiento), pues el 73% de antibióticos producidos a nivel mundial se utilizan en la producción animal (Boeckel *et al.*, 2019), éstos se implementan como promotores de crecimiento, o de manera preventiva para evitar que los animales enfermen (Carvajal *et al.*, 2019; Jiménez *et al.*, 2017). De éstos, hasta el 90% se excretan en la orina y heces del ganado, que después son dispersados en los fertilizantes usados en la agricultura, y a través de aguas subterráneas y escorrentía superficial (Ventola, 2015). Las mismas actividades antropogénicas (clínica, agricultura, ganadería) proveen nichos ricos en antibióticos para las bacterias que promueven el surgimiento de bacterias multirresistentes (Martínez-Martínez & Calvo, 2010).

Las bacterias multirresistentes se pueden transferir al ser humano con el consumo de carne contaminada, provocando intercambio de bacterias entre individuos y también intercambio de genes de resistencia entre bacterias. La OMS advierte sobre el problema que hay entorno a la elevada tasa de resistencia a los antibióticos utilizados con más frecuencia en tratamientos clínicos, por ejemplo, el ciprofloxacino es utilizado en el tratamiento contra infecciones urinarias y el 92.9% de *E. coli* reportadas resultaron resistentes a este fármaco, otro ejemplo son las septicemias provocadas por *E. coli*, donde la tasa media observada para *E. coli* resistente a cefalosporinas de tercera generación fue del 36.0%, esto provoca ineficacia en los tratamientos con antibióticos y es necesario el desarrollo de nuevos compuestos antimicrobianos, la OMS determinó que había 32 antibióticos en fase de desarrollo clínico capaces de combatir los patógenos de la lista de patógenos prioritarios, de éstos solo 6 se clasificaron como innovadores (OMS, 2021).

La resistencia a los antibióticos se debe a la presencia de genes que permiten el desarrollo de mecanismos que impiden efectuar el mecanismo de acción de estos compuestos, frecuentemente estos genes se encuentran en plásmidos conjugativos

e integrones (Jiménez *et al.*, 2017). Los integrones clase 1 son los que están asociados a la resistencia de antibióticos, además de ser los más estudiados, en el presente estudio, 6 de los 13 aislados fueron positivos ante la presencia de la integrasa clase 1, sin embargo, únicamente en 3 aislados se logró obtener la secuencia de la región variable, que al analizarla sugiere la presencia de 3 plásmidos diferentes en cada aislado, el psh13D-178-2 que presenta los genes *mph(A)*, *bla_{TEM-1}*, *aac(3)-IId*, *dfrA17*, *aadA5* y *sul1* (Qiu *et al.*, 2022), el plásmido pLSB54-mcr-1, que presenta los genes *bla_{CTX-M-14}*, *oqxA*, *oqxB*, *fosA3*, *floR*, *cmlA1*, *sul1*, *sul2*, *sul3* y *dfrA12* (Mao *et al.*, 2018), y el plásmido pKLP00221_2, que codifica para los genes *aac(6')-Ib*, *aadA2*, *aph(3')-1a*, *bla_{KPC-2}*, *bla_{OXA-9}*, *bla_{TEM-1A}*, *catA1*, *dfrA12*, *mph(A)*, *sul1* (Evans *et al.*, 2020). Los genes *bla* codifican para la producción de enzimas β -lactamasas, las KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*), son carbapenemasas de clase A y las OXA son carbapenemasas de clase D, capaces de hidrolizar carbapenémicos, cefalosporinas, penicilinas y aztreonam, se han identificado en enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores (Kafshnouchi *et al.*, 2021; Vera-Leiva *et al.*, 2017), y las BLEE (β -lactamasas de espectro extendido) son las de mayor relevancia al ser capaces de inactivar a las cefalosporinas de espectro extendido y han contribuido significativamente al aumento de la resistencia hacia los antibacterianos β -lactámicos, éstas se clasifican en tres grupos principales las TEM (temoniera), SHV (variable de sulfhidrilo) y CTX-M (cefotaximasas) (Galvis & Moreno, 2019). Los genes *aac(3)-IId*, *aac(6')-Ib*, *aadA5*, *aadA2* y *aph(3')-1a* confieren resistencia frente a los aminoglucósidos; los genes *dfrA17* y *dfrA12* son los responsables de la resistencia frente a trimetoprim; la resistencia a sulfonamidas esta mediada por los genes *sul* (*sul1*, *sul2* y *sul3*) que codifican para varias enzimas; los genes *oqxA* y *oqxB* causan resistencia a las fluoroquinolonas; el gen *fosA3* a la fosfomicina; la resistencia a fenicoles está regulada por los genes *floR*, *cmlA* y *catA1*; y el gen *mph(A)* brinda resistencia frente a macrólidos (Evans *et al.*, 2020; Faccone *et al.*, 2018; Mao *et al.*, 2018; Qiu *et al.*, 2022). La presencia de estos genes explica la elevada tasa de resistencia que tuvieron los aislados frente a las familias de antibióticos evaluadas, recordando también que ningún antibiótico presentó 100% de sensibilidad.

Existen diversos trabajos que buscan la presencia de integrones clase 1, en aislados de *E. coli* multirresistentes, Sunde *et al* (2015) encontraron la presencia de integrones clase 1 en 29 de 241 aislados de *E. coli* de carne, donde la combinación de casetes más abundante fue el *dfrA1-aadA1*, pero también se encontraron *aadA1*, *dfrA12-orfF-aadA2*, *oxa-30-aadA1*. Chen *et al* (2017) analizaron carne de canales bovinos, logrando aislar 45 cepas de *E. coli* con multirresistencia, de los cuales 28 dieron positivos ante la presencia de la integrasa clase I, encontraron en el 92.6% de los aislados resistencia a estreptomicina (*aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, and *aadB*) y 77.8% resistentes a trimetoprim (*dfrA1*, *dfrA17*, and *dfrA12*), la combinación de casetes con mayor frecuencia fue *dfr12-orfF-aadA2/dfr12*, presente en 7 aislados y en uno solo se encontró *dfr12-orfF-aadA2/aadA1-bla_{OXA-10}/dfr12* con resistencia a aminoglucósidos, trimetoprim y ampicilina. Rebbah *et al* (2017) analizaron 102 aislados de *E. coli* de carne molida, 69 presentaron integrón clase 1, que presentaban genes *bla_{CTX-M}* y *bla_{TEM}*, *qnrB* y *qnrS1* y también se encontraron genes *tet* (A y B), *sul* y *dfrA*. En otro estudio realizado por Jiménez *et al* (2017) de 34 aislados de *E. coli* de carne molida con multirresistencia, únicamente 2 presentaron el gen de la integrasa clase 1, de éstos uno presentó el gen *tetB* y el otro el arreglo de genes *bla_{CTX-M}-tetA-strA-strB*. Con estos resultados y los obtenidos en el presente estudio se aprecia la abundancia de integrones clase 1 y de la diversidad de genes y combinaciones de genes que se encuentran en ellos, derivado de la captura y expresión de genes exógenos que confieren resistencia no solo a antibióticos, también a desinfectantes y metales pesados, además de ubicarse en elementos genéticos móviles que permiten transferirse fácilmente entre bacterias por transferencia horizontal a una gama muy amplia de bacterias comensales y patógenas, asociadas con humanos y animales domésticos (Gillings *et al.*, 2015). En los integrones clase 1 se ubican más de 70 casetes de genes diferentes que confieren resistencia a la mayoría de los β -lactámicos, aminoglucósidos, trimetoprima, rifampicina, cloranfenicol, quinolonas, eritromicina y compuestos de amonio cuaternario (Kaushik *et al.*, 2018). En la familia de las *Enterobacteriaceae* es más común encontrar integrones clase 1 que las otras clases, Goldstein *et al* (2001) encontraron integrones clase 1 en 271 (48.8%) de 555 aislados de

enterobacterias, y únicamente en 23 (4.1%) aislados encontraron integrones clase 2. Otros autores han reportado prevalencia por arriba del 50% para integrones clase 1 en aislados de enterobacterias, por ejemplo, Malek *et al* (2015) reportaron prevalencia del 53,9% y Najjar *et al* (2010) encontraron esta clase de integrones en 79.1% de los aislados analizados. En cuanto a la prevalencia de integrones clase 1 en *E. coli*, Karimi *et al* (2020) realizaron un metaanálisis para investigar dicha prevalencia en aislados de fuentes animales en Irán, reportando una prevalencia de integron clase 1 en *E. coli* del 33%; en cambio Racewicz *et al* (2022) encontraron integrones clase 1 en el 60% de aislados de *E. coli*; Halaji *et al* (2020) reportaron prevalencia de 47% de integrones clase 1 en *E. coli* uropatógena, porcentaje similar al encontrado en el presente estudio, pues la prevalencia de integrones clase 1 fue del 46%, por eso es oportuno determinar la presencia de integrones clase 1 en aislados de *E. coli* multirresistente, ya que es frecuente encontrarlos y asociarlos con la resistencia a antibióticos, además de que el estudiar a los integrones clase 1 no solo ayudan a determinar los genes de resistencia, también fungen como un indicador de contaminación antropogénica, pues éstos prevalecen en ecosistemas dominados por humanos con exposición prolongada a agentes selectivos (antibióticos, detergentes y metales pesados) (An *et al.*, 2018). Los antibióticos usados en animales y humanos se excretan sin cambios entre el 30 y 90%, y que solo se eliminan parcialmente con el tratamiento de aguas residuales. Los antibióticos ingresan al suelo a través del mismo estiércol del animal el cual se usa como fertilizante o con el uso de aguas residuales en la agricultura; otro ejemplo es el uso de antibióticos en la acuicultura, donde el 80% de los antibióticos utilizados fluyen al medio ambiente. Es decir, derivado de las actividades humanas, existe una zona rica en antibióticos en los ecosistemas donde las bacterias habitan y adquieren la resistencia a los fármacos (Gillings *et al.*, 2015).

El análisis de componentes principales o APC, es una herramienta de la estadística multivariada que permite reducir la dimensionalidad de los datos en un conjunto menor de componentes que expliquen el total de la varianza observada (Mavrou, 2015). En nuestro estudio, la aplicación del ACP permitió ordenar y

agrupar los aislados de *E. coli* basándose en su resistencia o sensibilidad frente a antibióticos y la presencia o ausencia de genes de virulencia, con el objetivo de visualizar la relación entre ellos. Con este método se observó la cepa Mc6 como la más alejada del resto de aislados al no presentar ninguno de los 4 genes de virulencia evaluados y ser sensible a más antibióticos que el resto de cepas, podría considerarse como la cepa menos peligrosa, sin embargo, se tendría que evaluar la presencia de otros genes de virulencia. En el grupo 2, se incluyen tres aislados (McS2, McS7 y Mc5) que si bien, presentan algún gen de virulencia, también son los aislados que presentan sensibilidad a 4 antibióticos, contraste a los aislados del grupo 3, que podrían ser considerados los más peligrosos o con mayor potencial de riesgo, por presentar 2 o 3 genes de virulencia y presentar resistencia a 10 o más antibióticos.

Diversos autores han implementado este método en la microbiología, como Sonola *et al* (2022) realizaron un APC de cepas de *E. coli* aisladas de humanos, ratones, pollos y del suelo, para investigar la distribución y las relaciones de resistencia antimicrobiana y genes de virulencia de los aislados con respecto a sus diferentes fuentes de muestra. Kappell *et al* (2015) realizaron un estudio donde aplicaron un ACP en aislados de *E. coli* en términos de sus perfiles fenotípicos de resistencia a los antibióticos y su genotipo basado en la presencia de genes de resistencia a los antibióticos. Otro ejemplo es el estudio realizado por Mandal *et al* (2020) en el que estudiaron varias cepas de bacterias de relevancia clínica, incluida *E. coli*, en este estudio se realizó el ACP para evaluar la asociación entre resistencia a antibióticos y tolerancia a metales pesados. Los ACP son una herramienta útil para categorizar y ordenar las cepas obtenidas tomando en cuenta diferentes variables.

IX. Conclusiones

La carne molida de res presenta contaminación por cepas patógenas de *E. coli* y otras especies de interés en salud pública por causar enfermedades en humanos como *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Aeromonas hydrophila* y *Proteus vulgaris*.

Los métodos convencionales de identificación bacteriana son útiles como un método preliminar, es importante el uso de métodos moleculares para cerciorarse de que la identificación sea correcta.

La prevalencia identificada en este estudio para *E. coli* en la carne molida, que fue del 65% sugiere deficiencias sanitarias en la cadena de procesamiento primario y comercialización de carne en el municipio de Huasca de Ocampo, Hidalgo.

La presencia de los factores de virulencia *stx1*, *stx2* y *eaeA* indican que el 55% de los aislamientos son potencialmente patógenas para el humano al pertenecer al patotipo de las *E. coli* enterohemorrágicas.

Existe una elevada diversidad genética dentro de las cepas de *E. coli* aisladas, lo que sugiere que no tienen la misma ascendencia y por tanto la contaminación de la carne con estas cepas tuvo diferente origen.

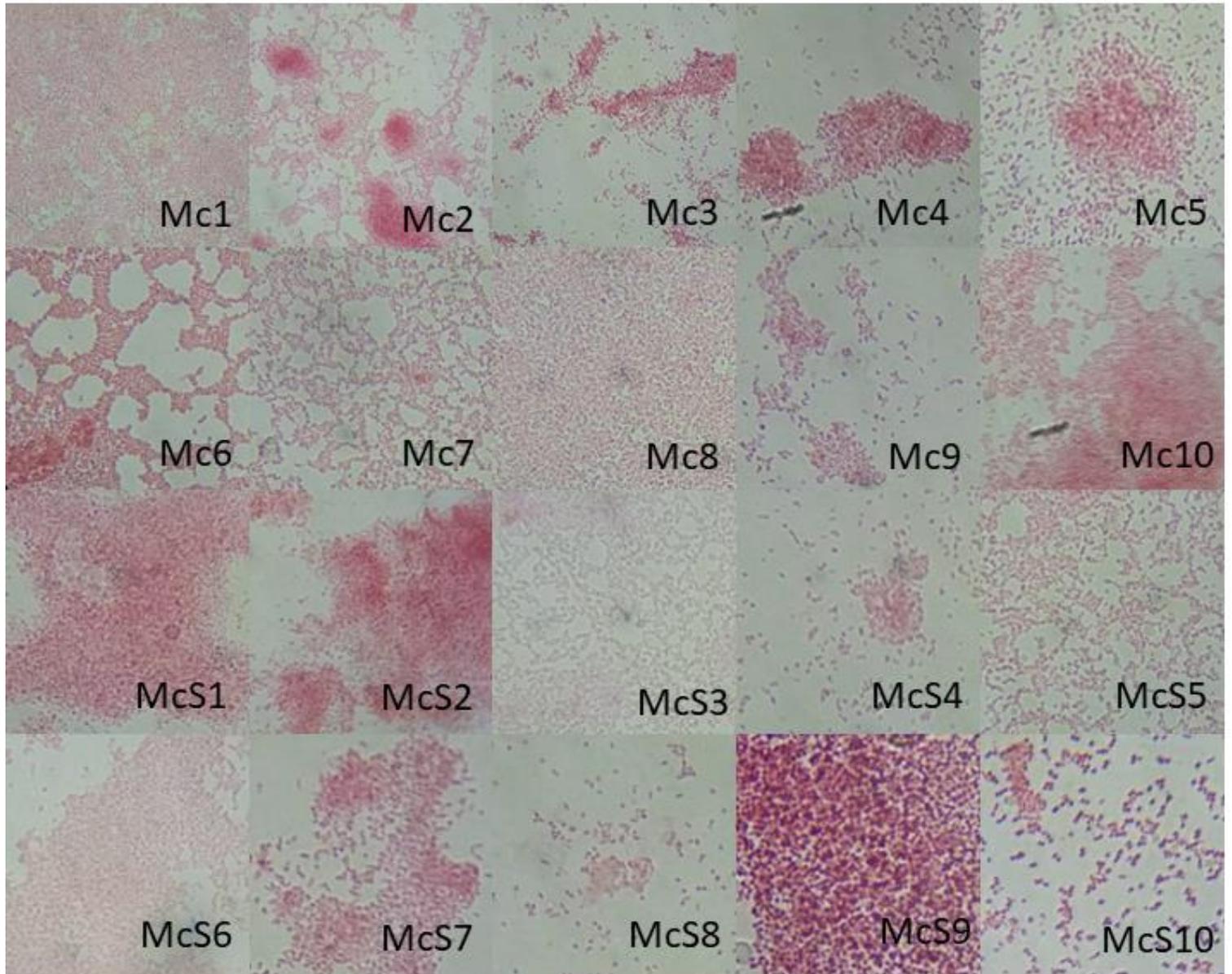
Las cepas presentaron multirresistencia, evidenciando relevancia del tratamiento de las infecciones por *E. coli*. Aunado a la presencia de integrones clase 1 que denotan la contaminación antropogénica como la posible responsable de la resistencia antimicrobiana.

X. Anexos

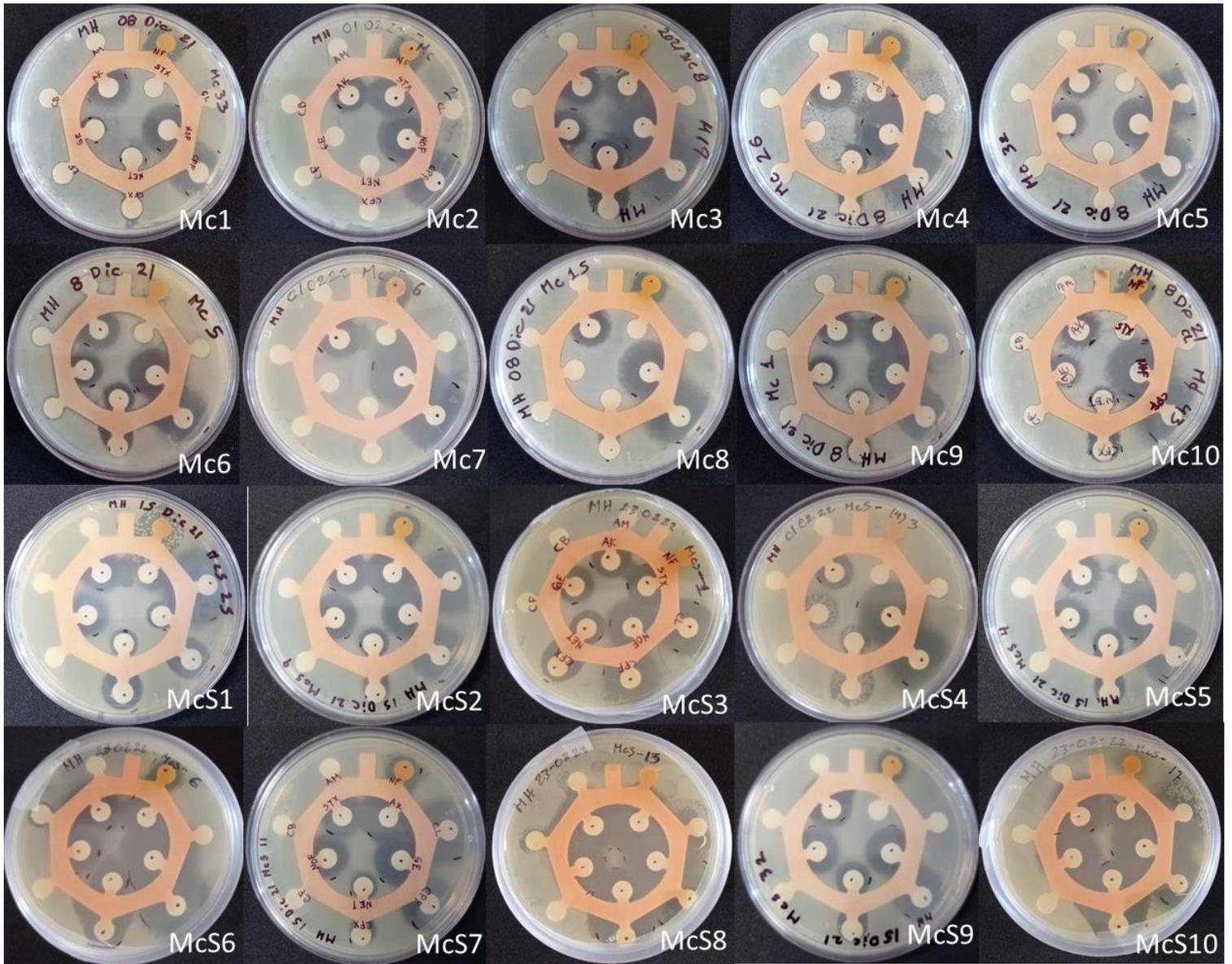
1. Primers utilizados en este estudio

Primer	Nombre	Secuencia 5'-3'	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
27F	16S rRNA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1505	Henriques <i>et al.</i> , 2006
1492R		GGTACCTTGTACGACTT		
ERIC_F	Secuencias Consenso Intergénicas Repetitivas de Enterobacterias	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	Variable	Versalovic <i>et al.</i> , 1991
ERIC_R		AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG		
Int11_F	Integrasa clase 1	CCTCCCGCACGATGATC	280	Henriques <i>et al.</i> , 2006
Int11_R		TCCACGCATCGTCAGGC		
5'_CS	Región variable integrón clase1	GGCATCCAAGCAGCAAG	Variable	Henriques <i>et al.</i> , 2006
3'_CS		AAGCAGACTTGACCTGA		
stx1_F	Toxina shiga clase 1	ATAAATCGCCATTGCTGACTAC	180	Paton & Paton, 1998
stx1_R		AGAACGCCCACTGAGATC		
stx2_F	Toxina shiga clase 2	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	255	Paton & Paton, 1998
stx2_R		TCGCCAGTTATCTGACATTCTG		
eaeA_F	Intimina	GACCCGGCACAAAGCATAAGC	384	Paton & Paton, 1998
eaeA_R		CCACCTGCAGCAACAAGAGG		
hlyA_F	Toxina α-hemolisina	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	534	Paton & Paton, 1998
hlyA_R		AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT		

2. Tinciones de Gram de los 20 aislados



3. Antibiogramas de los 20 aislados



XI. Bibliografía

- Abayneh, M., Tesfaw, G., Woldemichael, K., Yohannis, M., & Abdissa, A. (2019). Assessment of extended-spectrum β -lactamase (ESBLs)-producing *Escherichia coli* from minced meat of cattle and swab samples and hygienic status of meat retailer shops in Jimma town, Southwest Ethiopia. *BMC Infectious Diseases*, 19(897), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4554-6>
- Abdolshahi, A., & Shokrollahi, B. (2020). Food contamination. In S. Sabuncuoglu (Ed.), *Mycotoxins and Food Safety* (Vol. 34, Issue 8, pp. 57–67). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.77743>
- Adeolu, M., Alnajar, S., Naushad, S., & Gupta, R. S. (2016). Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., Morgane. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 5575–5599. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001485>
- Aguilar-García, C. (2015). Infección de piel y tejidos blandos por el género *Aeromonas*. *Medicina Interna de México*, 31, 701–708. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=62078>
- Allen, M. E. (2005). MacConkey Agar Plates Protocols. *American Society for Microbiology*, September 2005, 1–4. <https://asm.org/Protocols/MacConkey-Agar-Plates-Protocols>
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., & Ilio, C. Di. (2013). *Escherichia coli* in Europe: an overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10, 6235–6254. <https://doi.org/10.3390/ijerph10126235>
- Almasian-Tehrani, N., Alebouyeh, M., Armin, S., Soleimani, N., Azimi, L., & Shaker-Darabad, R. (2021). Overview of typing techniques as molecular epidemiology tools for bacterial characterization. *Cellular, Molecular and Biomedical Reports*, 1(2), 69–77. <https://doi.org/10.55705/cmbr.2021.143413.1016>
- An, X.-L., Chen, Q.-L., Zhu, D., Zhu, Y.-G., Gillings, M. R., & Su, J.-Q. (2018). Impact of wastewater treatment on the prevalence of integrons and the genetic diversity

- of integron gene cassettes. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(9), 1–15. <https://doi.org/10.1128/AEM.02766-17>
- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., Nisar, M. A., Alvi, R. F., Aslam, M. A., Qamar, M. U., Farooq, M. K., & Baloch, Z. (2023). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis Antibiotic. *Infection and Drug Resistance*, 2018(11), 1645–1658. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>
- Awan, F., Dong, Y., Wang, N., Liu, J., Ma, K., & Liu, Y. (2018). The fight for invincibility: Environmental stress response mechanisms and *Aeromonas hydrophila*. *Microbial Pathogenesis*, 116, 135–145. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.023>
- Bakhshi, B., Afshari, N., & Fallah, F. (2018). Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC)-PCR analysis as a reliable evidence for suspected *Shigella* spp. outbreaks. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49, 529–533. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.014>
- Banco Nacional de ADN. (2020). Programa de control de calidad de muestras de ADN y ARN. In *Universidad de Salamanca*. www.bancoadn.org
- Baran, A., Kwiatkowska, A., & Potocki, L. (2023). Antibiotics and bacterial resistance a short story of an endless arms race. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5777), 1–34. <https://doi.org/10.3390/ijms24065777>
- Bharadwaj, A., Rastogi, A., Pandey, S., Gupta, S., & Sohal, J. S. (2022). Multidrug-resistant bacteria: their mechanism of action and prophylaxis. *BioMed Research International*, 2022(ID 5419874), 1–17. <https://doi.org/10.1155/2022/5419874>
- Blount, Z. D. (2015). The unexhausted potential of *E. coli*. *ELIFE*, 4(e05826), 1–12. <https://doi.org/10.7554/eLife.05826>
- Boeckel, T., Pires, J., Silvester, R., Zhao, C., Song, J., Criscuolo, N., Gilbert, M., Bonhoeffer, S., & Laxminarayan, R. (2019). Global trends in antimicrobial resistance in animals in low and middle income countries. *Science*, 365(aaw1944), 1–5. <https://doi.org/10.1126/science.aaw1944>
- Boerlin, P., McEwen, S. A., Boerlin-Petzold, F., Wilson, J. B., Johnson, R. P., & Gyles, C. L. (1999). Associations between virulence factors of Shiga toxin-

- producing *Escherichia coli* and disease in humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(3), 497–503. <https://doi.org/10.1128/jcm.37.3.497-503.1999>
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601–608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Brenner, D. J., & Farmer III, J. J. (2005). *Enterobacteriaceae*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–24). John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00222>.
- Brusa, V. (2015). Desarrollo y validación intralaboratorio de una metodología para la detección y aislamiento de *Escherichia coli* productor de toxina shiga en carne bovina molida. Desarrollo de estrategias de control. Universidad Nacional de la Plata. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/51374>
- Cabrera-Maldonado, C., León-tello, G., Tejeda-Trujillo, F., Ramírez-Juárez, B., & Flores-Encarnación, M. (2013). Estudio preliminar para investigar *Salmonella* sp. y *E. coli* 0157:H7 en carne molida de res, de venta en supermercados en la ciudad de Puebla, México. *CienciaUAT*, 8(1), 64–69. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=441942930009>
- Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>
- Camacho-Silvas, L. A., Portillo-Gallo, J. H., Rivera-Cisneros, A. E., Sánchez-González, J. M., Franco-Santillán, R., Duque-Rodríguez, J., Velo-Méndez, G., & Ishida-Gutiérrez, C. (2021). Multirresistencia, resistencia extendida y panresistencia a antibacterianos en el norte de México. *Cirugía y Cirujanos*, 89(4), 426–434. <https://doi.org/10.24875/CIRU.20000304>
- Canata, M. G., Navarro, R., Velázquez, G., Rivelli, S., Rodríguez, F., Céspedes, A., Espínola, C., Canese, J., & Guillén, R. (2016). Caracterización molecular de factores de virulencia de aislados *Escherichia coli* obtenidas de heces de niños con gastroenteritis del Hospital Central de Instituto de Previsión Social en el

2012. *Pediatría (Asunción)*, 43(1), 13-17.
<http://dx.doi.org/10.18004/ped.2016.abril.13-17>
- Cardona-López, M. A., Padilla-Frausto, J. J., Madriz-Elisondo, A. L., Hinojosa-Dávalos, J., Navarro-Villarruel, C. L., Valera-Hernández, J. J., & Ibarra Velázquez, L. M. (2020). Identification of *Escherichia coli* pathotypes in ground beef from butcher shops of Guadalajara, Jalisco, Mexico. *Revista Bio Ciencias*, 7(e924), 1–12. <https://doi.org/10.15741/revbio.07.e924>
- Carhuapoma, V., Valencia, N., Huamán, T., Paucar, R., Hilario, E., & Huere, J. (2020). Resistencia antibiótica de *Salmonella* spp, *Escherichia coli* aisladas de alpacas (*Vicugna pacus*) con y sin diarrea. *La Granja: Revista de Ciencias de La Vida*, 31(1), 98–107. <http://doi.org/10.17163/lgr.n31.2020.08>
- Carrillo, L., Audisio, C., Bejarano, N., Gómez, S., Ancasi, G., & Benítez, M. (2007). *Manual de microbiología de los alimentos* (1º). Asociación Cooperadora de la Facultad de Ciencias Agrarias. <https://pdfcoffee.com/manual-de-microbiologia-de-los-alimentos-pdf-pdf-free.html>
- Carrol, K., Mietzner, T., Hobden, J., Detrick, B., Miller, S., Mitchell, T., Morse, S., McKerrow, J., & Sakanari, J. (2016). Microbiología médica. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (27a ed., Vol. 53, Issue 9). McGRAW-HILL.
- Carvajal, E., Hernández, W., Torres, M., López, D., Rueda, E., & Vásquez, M. (2019). Resistencia antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* aisladas de contenidos de bursa de Fabricio de aves para engorde. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 30(1), 430–437. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i1.14648>
- Castro-Escarpulli, G., Alonso-Aguilar, N. M., Sánchez, G. R., Bocanegra-García, V., Guo, X., Juárez-Enríquez, S. R., Luna-Herrera, J., Martínez, C. M., & Aguilera-Arreola, M. G. (2015). Identification and typing methods for the study of bacterial infections: a brief review and mycobacterial as case of study. *IMedPub Journals*, 7(1:3), 1–10. <https://www.semanticscholar.org/paper/Identification-and-Typing-Methods-for-theStudy-of-a-Castro-Escarpulli-Alonso-Aguilar/7932c77b1c7a684d11d200a070e80eec4de05cf5>
- Castro, A. M. (2014). Enfermedades bacterianas del aparato gastrointestinal. In R.

- Ossio (Ed.), *Bacteriología médica basada en problemas* (2a ed., pp. 201–259). Manual Moderno.
- CCMPH. Comité del Codex sobre Higiene de las Carnes. (2005). Código de prácticas de higiene para la carne (CXC 58-2005). In *Codex Alimentarius*. <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/codes-of-practice/es/>
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. (2022a). *Alimentos asociados a enfermedades*. Seguridad de Los Alimentos. <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/foods-linked-illness-es.html>
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. (2022b). *Prescripción y uso de antibióticos. Preguntas y respuestas sobre el uso de antibióticos*. Prescripción y uso de antibióticos. <https://www.cdc.gov/antibiotic-use/sp/should-know.html>
- Chattopadhyay, S., & Sokurenko, E. V. (2013). Evolution of pathogenic *Escherichia coli*. In M. Donnenberg (Ed.), *Escherichia coli: Pathotypes and Principles of Pathogenesis* (2º, pp. 45–72). Academic Press, Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-397048-0.00003-6>
- Chávez-Jacobo, V. M. (2020). La batalla contra las superbacterias: no más antimicrobianos, no hay ESKAPE. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 23, 1–11. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.202>
- Chen, C.-M., Ke, S.-C., Li, C.-R., Wu, Y.-C., Chen, T.-H., Lai, C.-H., Wu, X.-X., & Wu, L.-T. (2017). High diversity of antimicrobial resistance genes, class 1 integrons, and genotypes of multidrug-resistant *Escherichia coli* in beef carcasses. *Microbial Drug Resistance*, 23(7) 915-924. <https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0223>
- Chien, S., Sheen, S., Sommers, C., & Sheen, L. (2016). Modeling the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and uropathogenic *E. coli* in ground beef by high pressure processing and citral. *Food Control*, 73, 672–680. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.017>
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2017). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* (27th ed.) CLSI supplement M100.

Clinical and Laboratory Standards Institute.

- Coque-González, M. T. (2005). Papel de los integrones en la resistencia a los agentes antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23(5), 251–253. <https://doi.org/10.1157/13074963>
- Cortés-López, N. G., Ordóñez-Baquera, P. L., & Domínguez-Viveros, J. (2020). Herramientas moleculares utilizadas para el análisis metagenómico. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 11(4), 1150–1173. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i4.5202>
- Cortés-Ortiz, I. A., Rodríguez-Angeles, G., Moreno-Escobar, E. A., Tenorio-Lara, J. M., Torres-Mazadiego, B. P., & Montiel-Vázquez, E. (2002). Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco, México. *Salud Publica de Mexico*, 44(4), 297–302. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342002000400002>
- Cortés, J. (2003). Ácido ribonucleico, RNA. In L. Gaona (Ed.), *Biología celular y molecular* (pp. 23–42). Pearson Educación
- Culbreath, K. D., Simmon, K. E., & Petti, C. A. (2016). Application of identification of bacteria by DNA target sequencing in a clinical microbiology laboratory. In D. H. Persing, F. C. Tenover, R. T. Hayden, M. Ieven, M. B. Miller, F. S. Nolte, Y.-W. Tang, & A. van Belkum (Eds.), *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice* (3a ed., pp. 19–31). ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555819071.ch2>
- Darkwa, K., Agre, P., Olanmi, B., Iseki, K., Matsumoto, R., Powell, A., Bauchet, G., De Koeyer, D., Muranaka, S., Adebola, P., Asiedu, R., Terauchi, R., & Asfaw, A. (2020). Comparative assessment of genetic diversity matrices and clustering methods in white Guinea yam (*Dioscorea rotundata*) based on morphological and molecular markers. *Scientific Reports*, 10(13191), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69925-9>
- De La Fuente, N., Villarreal-Prieto, J., Díaz, M., & García, A. (2015). Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *Revista Mexicana Ciencias Farmacéuticas*, 46(2), 7–16. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952015000200007

- De la Maza, L., Pezzlo, M., Shigei, J., & Peterson, E. (2004). *Color Atlas of Medical Bacteriology*. ASM Press. <http://doi.org/10.1128/9781683671077.ch10>
- DGE Dirección General de Epidemiología. (2022). Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de la enfermedad diarreica aguda (EDA). Secretaría de Salud. https://epidemiologia.salud.gob.mx/gobmx/salud/documentos/manuales/44_Manual_EDA_2022.pdf
- DGE. Dirección General de Epidemiología (2023). *Informe semanal de vigilancia epidemiológica para EDA's semana 23 del 2023*. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Secretaría de Salud. <https://www.gob.mx/salud/documentos/informes-semanales-para-la-vigilancia-epidemiologica-de-enfermedades-diarreicas-agudas-2023>
- Di Conza, J. A., & Gutkind, G. O. (2010). Integrones: los coleccionistas de genes. *Revista Argentina de Microbiología*, 42, 63–78. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S032575412010000100014&script=sci_abstract
- Di Pillo, F., & Sotomayor, G. (2018). *Escherichia coli* productoras de toxinas Shiga O157 y No O157 en carne bovina, Chile. *Perfil de Riesgo, Agencia Chilena para la Inocuidad y Calidad Alimentaria (ACHIPIA)* 3(1). <https://www.achipia.gob.cl/wp-content/uploads/2018/06/Perfil-de-Riesgo-E-coli-STEC-en-carne-bovina-v1-2018-1.pdf>
- DOF. Diario Oficial de la Federación (1995). NOM-120-SSA1-1994. Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad para el proceso de alimetnos, bebidas no alcohólicas y alcohólicas. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4880184&fecha=28/08/1995#gsc.tab=0
- DOF. Diario Oficial de la Federación (2010). NOM-251-SSA1-2009. Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios. <https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/3980/salud/salud.htm>
- DOF. Diario Oficial de la Federación (2019). NOM-213-SSA1-2018. Productos y servicios. Productos cárnicos procesados y los establecimientos dedicados a

- su proceso. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5556645&fecha=03/04/2019#gsc.tab=0
- Drzewiecka, D. (2016). Significance and roles of *Proteus* spp. Bacteria in natural environments. *Microbial Ecology*, 72, 741–758. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0720-6>
- Du, D., Wang-Kan, X., Neuberger, A., van Veen, H., Pos, K., Piddock, L., & Luisi, B. (2018). Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nature Reviews Microbiology*, 16(9), 523–539. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0048-6>
- EFSA European Food Safety Authority. (2014). Scientific opinion on the public health risks related to the maintenance of the cold chain during storage and transport of meat . Part 2 (minced meat from all species). *EFSA Journal*, 12(7), 3783. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3783>
- Errecalde, J. (2004). Uso de antimicrobianos en animales de consumo (incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública). In Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. <http://www.fao.org/docrep/007/y5468s/y5468s00.htm#Contents>
- Espejo, R. T., & Plaza, N. (2018). Multiple ribosomal RNA operons in bacteria; their concerted evolution and potential consequences on the rate of evolution of their 16S rRNA. *Frontiers in Microbiology*, 9(1232), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01232>
- Espinosa, L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. In L. E. Eguiarte, V. Souza, & X. Aguirre (Eds.), *Ecología molecular* (1a ed., pp. 517–540). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad e Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Etebu, E., & Ariekpar, I. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*, 4, 90–101. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.96.2.535>

- Evans, D. R., Griffith, M. P., Sundermann, A. J., Shutt, K. A., Saul, M. I., Mustapha, M. M., Marsh, J. W., Cooper, V. S., Harrison, L. H., & Van Tyne, D. (2020). Systematic detection of horizontal gene transfer across genera among multidrug-resistant bacteria in a single hospital. *ELife*, 9(e53886), 1–20. <https://doi.org/10.7554/eLife.53886>
- Faccone, D., Lucero, C., Albornoz, E., Petroni, A., Ceriana, P., Campos, J., Viñas, M., Francis, G., Melado, R., & Corso, A. (2018). Emergence of azithromycin resistance mediated by the mph(A) gene in *Salmonella typhimurium* clinical isolates in Latin America. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 13, 237–239. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.04.011>
- FAO/OPS. Food and Agriculture Organization/Organización Panamericana de la Salud (2017). Manual Manipuladores de Alimentos. In *Gobierno de Cantabria. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud*. <https://www.fao.org/3/i7321s/i7321s.pdf>
- FAO/WHO. Food and Agriculture Organization/World Health Organization (2011). *Enterohaemorrhagic Escherichia coli in raw beef and beef products: approaches for the provision of scientific advice*. Microbiological Risk Assessment. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241548243>
- FAO. Food and Agriculture Organization. (2011). Preventing *E. coli* in food. <https://www.fao.org/documents/card/en/c/57512aaf-05c3-4762-b998-880ed7258bde/>
- FAO. Food and Agriculture Organization. (2022). World Food and Agriculture – Statistical Yearbook 2022. In *World Food and Agriculture – Statistical Yearbook 2022*. <https://doi.org/10.4060/cc2211en>
- FAO. Food and Agriculture Organization. (2023) Producción pecuaria en América Latina y el Caribe. <https://www.fao.org/americas/prioridades/produccion-pecuaria/es/#:~:text=FAO%20trabaja%20para%20mejorar%20la,Am%C3%A9rica%20Latina%20y%20el%20Caribe>
- Farfán-García, A. E., Ariza-Rojas, S. C., Vargas-cárdenas, F. A., & Vargas-Remolina, L. V. (2016). Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli*

- enteropatógena. *Revista Chilena de Infectología*, 33(4), 438–450. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182016000400009>
- FERG Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group. (2015). *Global burden foodborne diseases - from data to action*. <https://www.rivm.nl/en/food-safety/foodborne-diseases/ferg-symposium-2015>
- Fernández, A., García, C., Saéz, J., & Valdezate, S. (2010). *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología* (E. Cercenado & R. Cantón (eds.)). SEMIC.
- Fernández, S., Marcía, J., Bu, J., Baca, Y., Chavez, V., Montoya, H., Valera, I., Ruiz, J., Lagos, S., & Ore, F. (2021). Enfermedades transmitidas por Alimentos (ETAs); una alerta para el Consumidor. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 5(2), 2284–2298. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v5i2.433
- Fragoso-Castilla, P., Prada-Herrera, J., Peña-Córdoba, R., Herrera-Demares, P., Giraldo-Jaramillo, S., Pedraza-Claros, B., Ruidiaz-Méndez, Y., Morales-Lopez, S., & Mejía-Padilla, F. (2020). *La inocuidad de alimentos y su aporte a la seguridad alimentaria* (1ra ed.). EIDEC. <https://doi.org/10.34893/VPHP-XE18>
- Frederiksen, W. (2015). Citrobacter. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01143>.
- Fuentes, R., Talavera, M., Vázquez, J., Soriano, E., & Gutiérrez, A. (2013). Presencia de integrones clase I en *Escherichia coli* aislada de productos cárnicos en plantas Tipo Inspección Federal (TIF) en el Estado de México. *Veterinaria Mexico*, 44(1), 23–30. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-50922013000100003&lang=es
- Galván, A., Rosales, A., & Díaz, J. (2011). Estudio comparativo sobre los microorganismos presentes en la carne molida proveniente de una cadena de supermercados y mercados en el Municipio de Ecatepec. *Nacameh*, 5(1), 1–9. <http://cbs.izt.uam.mx/nacameh/>
- Galvis, F., & Moreno, L. (2019). Caracterización molecular y detección de genes blaCTX-M grupos 1 y 9 en *Klebsiella pneumoniae* resistentes a ceftazidima, en

- un hospital de San José de Cúcuta, Colombia. *Revista Chilena de Infectología*, 36(3), 304–311. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182019000300304>
- Garbaj, A. M., Awad, E. M., Azwai, S. M., Abolghait, S. K., Naas, H. T., Moawad, A. A., Gammoudi, F. T., Barbieri, I., & Eldaghayes, I. M. (2016). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in milk and dairy products from Libya: Isolation and molecular identification by partial sequencing of 16S rDNA. *Veterinary World*, 9(11), 1184–1189. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.1184-1189>
- Gillings, M. R., Gaze, W. H., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, J. M., & Yong-Guan, Z. (2015). Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *The ISME Journal*, 9, 1269–1279. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.226>
- Goldstein, C., Lee, M. D., Sanchez, S., Hudson, C., Phillips, B., Register, B., Grady, M., Liebert, C., Summers, A. O., White, D. G., & Maurer, J. J. (2001). Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), 723–726. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.3.723-726.2001>
- Gomes, T., Elias, W., Scaletsky, I., Guth, B., Rodrigues, J., Piazza, R., Ferreira, L., & Martinez, M. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47S, 3–30. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>
- Gordon, D. M. (2013). The ecology of *Escherichia coli*. In M. S. Donnenberg (Ed.), *Escherichia coli Pathotypes and Principles of Pathogenesis* (2°, pp. 3–15). Academic Press, Elsevier.
- Greig, J., Nesbakken, T., Stephan, R., & Kasuga, F. (2005). Meat and meat products. In T. A. Roberts, J. L. Cordier, L. Gram, R. B. Tompkin, J. I. Pitt, L. G. Gorris, & K. M. Swanson (Eds.), *Microorganisms in foods 6: microbial ecology of food commodities* (2da ed., pp. 1–106). Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Guilhelmelli, F., Vilela, N., Albuquerque, P., Derengowski, L. da S., Silva-Pereira, I., & Kyaw, C. M. (2013). Antibiotic development challenges: The various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Frontiers in Microbiology*, 4(353), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00353>

- Hajian, S., Rahimi, E., & Mommtaz, H. (2011). A 3-year study of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle, camel, sheep, goat, chicken and beef minced meat. *International Conference on Food Engineering and Biotechnology*, 9, 162–166. <https://www.semanticscholar.org/paper/A-3-year-study-of-Escherichia-coli-O-157-%3A-H-7-in-%2C-Hajian-Rahimi/4d3871a7251ca113e2232e96ae812b1ba6f6ad8a>
- Halaji, M., Feizi, A., Mirzaei, A., Ebrahim-Saraie, H., Fayyazi, A., Ashraf, A., & Havaei, S. A. (2020). The global prevalence of class 1 integron and associated antibiotic resistance in *Escherichia coli* from patients with urinary tract infections, a systematic review and meta-analysis. *Microbial Drug Resistance*, 26(10), 1208–1218. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0467>
- Henriques, I. S., Fonseca, F., Alves, A., Saavedra, M. J., & Correia, A. (2006). Occurrence and diversity of integrons and β -lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. *Research in Microbiology*, 157, 938–947. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.09.003>
- Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. *American Society For Microbiology*, December 2009, 1–13. <https://asm.org/Protocols/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Pro>
- Irwansyah, E., Pratama, E. S., & Ohlyver, M. (2020). Clustering of cardiovascular disease patients using data mining techniques with principal component analysis and K-medoids. *Preprints*, August, 1–12. <https://doi.org/10.20944/preprints202008.0074.v1>
- Jiménez, M. A., Galas, M., Corso, A., Hormazábal, J. C., Duarte, C., Salgado, N., Ramón-Pardo, P., & Melano, R. (2019). Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 43, 1–8. <https://doi.org/10.26633/rpsp.2019.65>
- Jiménez, R., Gudiño, L., Aguilar, J., & Loeza, P. (2017). Caracterización molecular de *Escherichia coli* resistente a antibióticos aislada de mastitis bovina en Michoacán, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8(4), 387–396. <http://dx.doi.org/10.22319/rmcp.v8i4.4251>

- Johnson, J. W., Fisher, J. F., & Mobashery, S. (2013). Bacterial cell-wall recycling. *Annals of the New York Academy Sciences*, 1277(1), 54–75. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06813.x>
- Jure, M. A., Condorí, S., Leotta, G. A., Chinen, I., Miliwebsky, E., Allori, C., Aulet, O., & De Castillo, M. C. (2010). Detección, aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de carne molida fresca proveniente de carnicerías de Concepción, provincia de Tucumán. *Revista Argentina de Microbiología*, 42(4), 284–287. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412010000400009
- Kafshnouchi, M., Safari, M., Khodavirdipour, A., Bahador, A., Hamid, S., Sina, M., Saidijam, M., & Yousef, M. (2021). Molecular detection of blaOXA-type carbapenemase genes and antimicrobial resistance patterns among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Global Medical Genetics*, 2(2022), 118–123. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1740019>. ISSN 2699-9404.
- Kappell, A. D., DeNies, M. S., Ahuja, N. H., Ledebor, N. A., Newton, R. J., & Hristova, K. R. (2015). Detection of multi-drug resistant *Escherichia coli* in the urban waterways of Milwaukee, WI. *Frontiers in Microbiology*, 6(336). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00336>
- Karimi, M., Halaji, M., & Nouri, S. (2020). Prevalence of class 1 integron in *Escherichia coli* isolated from animal sources in Iran: A systematic review and meta-analysis. *Tropical Medicine and Health*, 48(16), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s41182-020-00202-1>
- Kaushik, M., Kumar, S., Kapoor, R. K., Viridi, J. S., & Gulati, P. (2018). Integrons in *Enterobacteriaceae*: diversity, distribution and epidemiology. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 51, 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.10.004>
- Kirmusaoğlu, S., Gareayaghi, N., & Kocazeybek, B. (2019). Introductory Chapter: The action mechanisms of antibiotics and antibiotic resistance. In S. Kirmusaoğlu (Ed.), *Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods* (pp. 1–9). IntechOpen.

<https://doi.org/10.5772/intechopen.85211>

- Kojima, S., & Nikaido, H. (2013). Permeation rates of penicillins indicate that *Escherichia coli* porins function principally as non specific channels. *PNAS*, *110*(28), E2629–E2634. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310333110>
- Lal, A., & Cheeptham, N. (2007). *Eosin-Methylene Blue Agar Plates Protocol*. September 2007, 1–7. <https://doi.org/https://asm.org/Protocols/MacConkey-Agar-Plates-Protocols>
- Lehman, D. (2005). Triple Sugar Iron Agar. *American Society for Microbiology*, September 30, 2005, 1–7. <https://asm.org/Protocols/Triple-Sugar-Iron-Agar-Protocols>
- Li, W., Atkinson, G. C., Thakor, N. S., Allas, U., Lu, C. C., Yan Chan, K., Tenson, T., Schulten, K., Wilson, K. S., Hauryliuk, V., & Frank, J. (2013). Mechanism of tetracycline resistance by ribosomal protection protein Tet(O). *Nature Communications*, *4*(1477), 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms2470>
- Liu, L., Wang, N., Wu, A. Y., Lin, C., Lee, C., & Liu, C. (2018). *Citrobacter freundii* bacteremia: Risk factors of mortality and prevalence of resistance genes. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, *51*, 565–572. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2016.08.016>
- Liu, X., Thungrat, K., & Boothe, D. M. (2016). Occurrence of OXA-48 Carbapenemase and other β -lactamase genes in ESBL-producing multidrug resistant *Escherichia coli* from dogs and cats in the United States, 2009 – 2013. *Frontiers in Microbiology*, *7*(1057), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01057>
- López-Ramírez, K., Díaz-Maldonado, K., Vergara, M., Santamaría-Veliz, O., Serquén-López, L., Canelo, B., León-Jimenez, F., & Aguilar-Gamboa, F.-R. (2018). Patrón de clonalidad mediante ERIC-PCR y REP-PCR de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido, aisladas de pacientes con infección urinaria intrahospitalaria. Hospital Regional Lambayeque, Perú. *Horizonte Médico*, *18*(2), 11–18. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.24265/horizmed.2018.v18n2.03>
- MacWilliams, M. P. (2009a). Citrate Test. *American Society for Microbiology*, 1–7.

linguistica/article/view/283

- Mazel, D. (2006). Integrons: Agents of bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 4, 608–620. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1462>
- Mcdevitt, S. (2009). Methyl Red and Voges-Proskauer Test Protocols. *American Society for Microbiology*, 1–9. <https://asm.org/Protocols/Methyl-Red-and-Voges-Proskauer-Test-Protocols>
- Menchaca-Armenta, I., & Gutiérrez-Jaimes, L. W. (2022). Diarrea aguda en México. Revisión epidemiológica actual. *Gaceta Hidalguense de Investigación En Salud*, 10(1), 8–11. <https://salud.hidalgo.gob.mx/contenido/informacion/gaceta/2022/Gaceta-1-2022.DiarreaM%C3%A9xico%202.pdf>
- Méndez, C., Vergaray, G., Morante, H. Y., Flores, P. R., & Gamboa, R. A. (2013). Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de carne molida de bovino en Lima-Perú. *Revista Peruana de Biología.*, 20(2), 159–164. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332013000200008
- Miotto, M., Ossai, S. A., Meredith, J. E., Barretta, C., Kist, A., Prudencio, E. S., Vieira, C. R. W., & Parveen, S. (2019). Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolated from mollusks in Brazil and the United States. *Microbiology Open*, 8(e738), 1–14. <https://doi.org/10.1002/mbo3.738>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2), 1–37. <https://doi.org/doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399, 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Najar, A. P., Pulido, I. Y., Valenzuela a, E. M., Reguero, M. T., & Mantilla, J. R. (2010). Prevalencia de integrones clase 1 en enterobacterias de centros

- hospitalarios de Bogotá, Colombia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 30(2), 42-48. <https://doi.org/https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=27309>
- NIH. National Institutes of Health. (2023a). *NUCLEIC ACIDS*. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Nucleic-Acids>
- NIH. National Institutes of Health. (2023b). *PROTEIN*. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Protein>
- Nobili, G., Franconieri, I., La Bella, G., Basanisi, M. G., & La Salandra, G. (2017). Prevalence of verocytotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from raw beef in southern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 257, 201–205. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.022>
- O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. *Review on Antimicrobial Resistance*. https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf
- OIRSA. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (2018). *Manual de Introducción a la Inocuidad de Alimentos*. Dirección Regional de Inocuidad de los Alimentos. <https://www.oirsa.org/contenido/2019/Manual%20de%20Introduccion%20a%20la%20Inocuidad%20de%20los%20alimentos%20-%20OIRSA.pdf>
- Olaiz-Fernández, G. A., Gómez-Peña, E. G., Juárez-Flores, A., Vicuña-de Anda, F. J., Morales-Ríos, J. E., & Carrasco, O. F. (2020). Panorama histórico de la enfermedad diarreica aguda en México y el futuro de su prevención. *Salud Publica de Mexico*, 62(1), 25–35. <https://www.scielosp.org/article/spm/2020.v62n1/25-35/es/>
- OMS. Organización Mundial de la Salud. (2015). *Informe de la OMS señala que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria*. Comunicado de Prensa GINEBRA. <https://www.who.int/es/news/item/03-12-2015-who-s-first-ever-global-estimates-of-foodborne-diseases-find-children-under-5-account-for-almost-one-third-of-deaths>
- OMS. Organización Mundial de la Salud. (2016). *Plan de acción mundial sobre la*

- resistencia a los antimicrobianos*. Organización Mundial de la Salud. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255204/9789243509761-spa.pdf>
- OMS. Organización Mundial de la Salud. (2021). *Resistencia a los antimicrobianos*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Palomino-Camargo, C., & González-Muñoz, Y. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31(3), 535–546. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342014000300020
- Paton, A. W., & Paton, J. C. (1998). Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for *stx 1*, *stx 2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb O111*, and *rfb O157*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(2), 598–602. <http://doi.org/10.1128/JCM.36.2.598-602.1998>
- Pedraza, B., & Cordoba, L. (2020). La calidad higiénica de los alimentos y su aporte a la seguridad alimentaria. In *La inocuidad de alimentos y su aporte a la seguridad alimentaria* (1ra Vo.l 1, pp. 10–18). Editorial EIDEC. <https://doi.org/10.34893/VPHP-XE18>
- Penner, J. L. (2015). Proteus. In *Bergey's Manual Trust* (pp. 2–17). John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01162>.
- Pérez-Cano, H., & Robles-Contreras, A. (2013). Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista Médica*, 4(3), 186–191. <http://www.medigraphic.com/pdfs/revmed/md-2013/md133i.pdf>
- Pigüave, J., Vélez, M., & Cevallos, B. (2019). Capítulo IV: Los bacilos Gram (+). In *Microbiología y salud* (1ra ed., pp. 67–92). 3ciencias.
- Pérez, M., & Mota, M. (2008). Morfología y estructura bacteriana. In *Temas de Bacteriología y Virología Médica* (3ra ed., pp. 25–46). Universidad de la República.
- Qiu, S., Liu, K., Yang, C., Xiang, Y., Min, K., Zhu, K., Liu, H., Du, X., Yang, M., Wang, L., Sun, Y., Zhou, H., Mahe, M., Zhao, J., Li, S., Yu, D., Hawkey, J., Holt, K. E.,

- Baker, S., Song, H. (2022). A *Shigella sonnei* clone with extensive drug resistance associated with waterborne outbreaks in China. *Nature Communications*, 13(7365), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35136-1>
- Racewicz, P., Majewski, M., Biesiada, H., Nowaczewski, S., Wilczyński, J., Wystalska, D., Kubiak, M., Pszczoła, M., & Madeja, Z. E. (2022). Prevalence and characterisation of antimicrobial resistance genes and class 1 and 2 integrons in multiresistant *Escherichia coli* isolated from poultry production. *Scientific Reports*, 12(6062), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09996-y>
- Radilla, C., Gutiérrez, R., Vega, S., Del Muro, R., Ruiz, J., Arnau, N., García, M., San Martín, U., Safdie, M., Radilla, M., & Garduño, G. (2019). *Manual de Inocuidad*. Secretaría de Salud, Sistema Nacional Para el Desarrollo Integral de la Familia. https://sitios1.dif.gob.mx/alimentacion/docs/manual_inocuidad.pdf
- Ramírez, J., & Gómez, C. (2003). Ácido desoxirribonucleico, DNA. In L. Gaona (Ed.), *Biología celular y molecular* (pp. 3–22). Pearson Educación.
- Ramos-Vivas, J. (2020). Microbiología de *Hafnia alvei*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 38(Supl 1), 1–6. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2020.02.001>
- Ranjbar, R., Karami, A., Farshad, S., Giammanco, G. M., & Mammina, C. (2014). Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide. *New Microbiologica*, 37, 1–15. <https://www.researchgate.net/publication/260218307>
- Ranjbar, R., Tabatabaee, A., Behzadi, P., & Kheiri, R. (2017). Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR) genotyping of *Escherichia coli* strains isolated from different animal stool specimens. *Iranian Journal of Pathology*, 12(1), 25–34. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5938721/>
- Rebbah, N., Messai, Y., Chatre, P., Haenni, M., Madec, J., & Bakour, R. (2017). Diversity of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* isolates from retail raw ground beef: first report of CTX-M-24 and CTX-M-32 in

- Algeria. *Microbial Drug Resistance*, 24(7), 896–908.
<https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0171>
- Reinoso, E., Dieser, S., & Moliva, M. (2022). *Manual de herramientas moleculares: conceptos básicos y técnicas empleadas en el estudio de la genética microbiana* (1a ed.). UniRío editora.
- Reyes-Rodríguez, N. E., Talavera-Rojas, M., Varela-Guerrero, J. A., Barba-León, J., Gutiérrez-Castillo, A. del C., & Alonso-Fresán, U. (2013). Prevalencia y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* O157:H7 aislada de canales de bovinos sacrificados en rastros del altiplano central Mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 4(2), 235–242.
https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242013000200009#:~:text=coli%20O157%3AH7%20representan%2C%20ya,el%20estado%20de%20Jalisco%3B%20M%3%A9xico.
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482–501.
<https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- Ribeiro, J. C., Tamanini, R., Fritegato, B., Marangon, A., de Godoi, F., Fernandes, F., Assis, N., & Beloti, V. (2016). Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk. *Semina: Ciências Agrárias*, 37(5), 3069–3078. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5p3069>
- Rípodas-Navarro, A., Fernández-Moreira, D., & Macho-Martínez, M. (2017). Investigación de *Escherichia Coli* productor de toxinas Shiga (STEC) en carnes y derivados cárnicos. *Sanidad Mil*, 73(3), 147–152.
<https://doi.org/10.4321/S1887-85712017000300002>
- Rodicio, M. D. R., & Mendoza, M. D. C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4), 238–245. <https://doi.org/10.1157/13059055>
- Ruiz-Roldán, L., Martínez-Puchol, S., Gomes, C., Palma, N., Riveros, M., Ocampo, K., Durand, D., Ochoa, T., Ruiz, J., & Pons, M. (2018). Presencia de

- Enterobacteriaceae* y *Escherichia coli* multirresistente a antimicrobianos en carne adquirida en mercados tradicionales en Lima. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 35(3), 425–432. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.353.3737.425>
- Sabaté, M., & Prats, G. (2002). Estructura y función de los integrones. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 20(7), 341–345. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(02\)72813-9](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(02)72813-9)
- SADER Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2015). *Ganadería bovina y sus derivados*. <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/ganaderia-bovina-y-sus-derivados>
- Sánchez, S., Ropmecin, P., Guachalla, L. M., & Iñiguez, V. (2006). Caracterización geno-fenotípica de aislados de *Escherichia coli* (AEEC) de pacientes pediátricos con procesos diarreicos infecciosos en la ciudad de La Paz: Implicancias para el diagnóstico y epidemiología de las enfermedades diarreicas agudas. *Revista Chilena de Pediatría*, 77(4), 412–427. <https://doi.org/10.4067/S0370-41062006000400013>
- Santos, A. C., Fernandes, F., Silva, M., & Tardelli, T. (2020). Diversity of Hybrid- and Hetero-Pathogenic *Escherichia coli* and their potential implication in more severe diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(339), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00339>
- Sekhar, M. S., Sharif, N. M., Rao, T. S., & Metta, M. (2017). Genotyping of virulent *Escherichia coli* obtained from poultry and poultry farm workers using Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase Chain Reaction. *Veterinary World*, 10(11), 1292–1296. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1292-1296>
- Sharafa, E. F., & Shabanaa, I. I. (2016). Prevalence and molecular characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from human and sheep in Al-Madinah Al-Munawarah. *Infectio*, 21(2). <https://doi.org/10.22354/in.v21i2.651>
- Sharif, M. K., Javed, K., & Nasir, A. (2018). Foodborne Illness: threats and control. In A. Holban & A. Grumezescu (Eds.), *Foodborne Diseases* (pp. 501–523). Academic Press, Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811444-5.00015->

- SIAP Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2018). *La ganadería: símbolo de fortaleza del campo mexicano*. <https://www.gob.mx/siap/articulos/la-ganaderia-simbolo-de-fortaleza-del-campo-mexicano>
- SIAP Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2022a). *Escenario mensual de productos agroalimentarios*. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/784852/Carne_de_bovino_Noviembre.pdf
- SIAP Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2022b). *Panorama Agroalimentario 2022*. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/panorama-agroalimentario-258035>
- Smith, A., & Hussey, M. (2005). Gram Stain Protocols. *American Society For Microbiology*, September 2005, 1–9. <https://doi.org/https://asm.org/Protocols/Gram-Stain-Protocols>
- Soberón, F. (2003). Las proteínas. In L. Gaona (Ed.), *Biología celular y molecular* (pp. 43–62). Pearson Educación.
- Soltani, M., Peighambari, S. M., Askari, B., & Sadrzadeh, A. (2012). Molecular typing of avian *Escherichia coli* isolates by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequences-Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR). *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 6(3), 143–148. <https://doi.org/10.22059/IJVM.2012.29999>
- Sonola, V. S., Katakweba, A., Misinzo, G., & Matee, M. I. (2022). Molecular epidemiology of antibiotic resistance genes and virulence factors in multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from rodents, humans, chicken, and household soils in Karatu, Northern Tanzania. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(9), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijerph19095388>
- Soto-Varela, Z., Pérez-Lavalle, L., & Estrada-Alvarado, D. (2016). Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en

- colombia. *Salud Uninorte*, 32(1), 105–122.
<https://doi.org/10.14482/sun.32.1.8598>
- Srinivasan, R., Karaoz, U., Volegova, M., Mackichan, J., Kato-Maeda, M., Miller, S., Nadarajan, R., Brodie, E., & Lynch, S. (2015). Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. *PLoS ONE*, 10(2), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117617>
- Stackebrandt, E., & Jonas, E. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today*, 8(4), 152–155.
https://socgenmicrobiol.org.uk/pubs/micro_today/pdf/110602.pdf
- Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, V., Rosales, M., & de Haan, C. (2009). *La larga sombra del ganado: problemas ambientales y opciones*. FAO.
<https://www.fao.org/publications/card/en/c/0ab27af5-b590-5c7a-873d-eececea6837a/>
- Stoddard, S. F., Smith, B. J., Hein, R., Roller, B. R. K., & Schmidt, T. M. (2015). rrnDB: Improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D593–D598. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1201>
- Suardana, I. W. (2014). Analysis of nucleotide sequences of the 16S rRNA gene of novel *Escherichia coli* strains isolated from feces of human and bali cattle. *Journal of Nucleic Acids*, 2014(475754), 1–7.
<https://doi.org/10.1155/2014/475754>
- 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>
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outtersson, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., Zorzet, A. (2017). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis.

- The Lancet Infectious Diseases*, 1–10. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
- Tan, E. Y., Mohammed, A., & Soon, J. M. (2016). Identification of *Escherichia coli* strains from water vending machines of Kelantan, Malaysia using 16S rRNA gene sequence analysis. *Exposure and Health*. <https://doi.org/10.1007/s12403-016-0194-x>
- Tanko, N., Tolulope, O. A., Olajumoke, B. R., Ong, E. B. B., Yahaya, M., & Olalekan, O. B. (2021). Genetic relatedness in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from clinical isolates using Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction. *International Journal of Health Sciences*, 15(5), 18–27. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8434838>
- Tian, R. M., Cai, L., Zhang, W. P., Cao, H. L., & Qian, P. Y. (2015). Rare events of intragenus and intraspecies horizontal transfer of the 16S rRNA gene. *Genome Biology and Evolution*, 7(8), 2310–2320. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv143>
- Troncoso, C., Pavez, M., Santos, A., Salazar, R., & Barrientos, L. (2017). Implicancias estructurales y fisiológicas de la célula bacteriana en los mecanismos de resistencia antibiótica. *International Journal of Morphology*, 35(4), 1214–1223. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022017000401214>
- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis part 1: causes and threats. *P&T*, 40(4), 277–283. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4378521/>
- Vera-Leiva, A., Barría-Loaiza, C., Carrasco-Anabalón, S., Lima, C., Aguayo-Reyes, A., Domínguez, M., Bello-Toledo, H., & González-Rocha, G. (2017). KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. *Revista Chilena de Infectología*, 34(5), 476–484. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182017000500476>
- Versalovic, J., Koeuth, T., & Lupski, J. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19(24), 6823–6831. <http://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>
- Vila, J., & Zboromyrska, Y. (2012). Brotes epidémicos causados por *Escherichia coli*

- diarreogénicas. *Gastroenterologia y Hepatologia*, 35(2), 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2011.10.007>
- Wan, M. T., & Chou, C. C. (2015). Class 1 integrons and the antiseptic resistance gene (qacE Δ 1) in municipal and swine slaughterhouse wastewater treatment plants and wastewater-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12, 6249–6260. <https://doi.org/10.3390/ijerph120606249>
- Williams, N. D., Torres, A. G., & Lloyd, S. J. (2011). Evolution and epidemiology of diarrheagenic *Escherichia coli*. In A. G. Torres (Ed.), *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*. (pp. 8–24). Bentham Books.
- Yauri, M. F., Alcocer, I., & Rodríguez-Riglos, M. (2016). Caracterización de la región variable de integrones clase 1 en aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenemes. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 37(2), 31–38. <https://doi.org/10.26807/remcb.v37i2.5>
- Zahariev, M., Chen, W., Visagie, C. M., & Lévesque, C. A. (2018). Cluster oligonucleotide signatures for rapid identification by sequencing. *BMC Bioinformatics*, 19(395), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2363-3>
- Zepeda-Velazquez, A. P., Gómez-De-Anda, F.-R., Aguilar-Mendoza, L. F., Castrejón-Jiménez, N., Hernández-González, J., Varela-Guerrero, J., De la Rosa-Arana, J.-L., Vega-sánchez, V., & Reyes-rodíguez, N. E. (2023). Bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*) as a potential source of foodborne disease. *Journal of Food Protection*, 86(4), 100067. <https://doi.org/10.1016/j.jfp.2023.100067>
- Zimbro, M. J., Power, D. A., Miller, S. M., Wilson, G. E., & Johnson, J. A. (2009). Difco & BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media. In *Citeseer* (2da ed.). Becton, Dickinson and Company. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010316\)40:6<9823::AID-ANIE9823>3.3.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010316)40:6<9823::AID-ANIE9823>3.3.CO;2-C)
- Zúñiga, I. R., & Caro, J. (2017). Enfermedades transmitidas por los alimentos: una mirada puntual para el personal de salud. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 37(3), 95-104FPF. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=86155>