



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

PROGRAMA MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

“RESISTENCIA A β -LACTÁMICOS Y QUINOLONAS EN
AISLAMIENTOS DE *Escherichia coli* OBTENIDOS DE CANALES DE
BOVINOS EN EL ESTADO DE MÉXICO Y JALISCO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

P R E S E N T A:

MVZ. SAUL AGUILAR MONTES DE OCA

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México 2014



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

PROGRAMA MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

“RESISTENCIA A β -LACTÁMICOS Y QUINOLONAS EN
AISLAMIENTOS DE *Escherichia coli* OBTENIDOS DE CANALES DE
BOVINOS EN EL ESTADO DE MÉXICO Y JALISCO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

P R E S E N T A:

MVZ. SAUL AGUILAR MONTES DE OCA

COMITÉ TUTORAL

Director de Tesis

Dr. Martin Talavera Rojas

Asesores

Dr. Edgardo Soriano Vargas

Dra. Jeannette Barba León

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, México Mayo 2014

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó dentro del proyecto de investigación titulado “Implementación de técnicas moleculares para el diagnóstico de *Salmonella* spp, *Escherichia coli* O157:H7 y *Campylobacter* spp en materia prima y productos cárnicos en el Valle de Toluca, México” con clave 3182/2012CHT.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, UAEM-FMVZ (PCARN).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para la realización de mis estudios.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UAEM, por permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones.

A mi comité tutorial: Dr. Martín Talavera Rojas, Dr. Edgardo Soriano Vargas y Dra. Jeannette Barba León, por su valiosa asesoría, apoyo y por la gran paciencia que me han tenido. Gracias.

DEDICATORIAS

A MI NACIÓN, MEXICO

Que es sin lugar a dudas un país con muchas oportunidades

A mi madre Margarita C. Montes de Oca Heredia, a quien tengo muchas cosas que agradecer: el simple hecho de darme vida, el darme educación, por sus grandes esfuerzos y sacrificios, incluso por soportarme. Te amo, como no se puede amar a ninguna otra mujer.

A mi padre, Tomas Aguilar Martinez.

A mis abuelos, su cariño, apoyo y educación, nunca dejan de enseñarme algo nuevo a pesar del paso de los años.

A mi amiga Raquel con quien me gusta mucho platicar. A Ana Maria, por hacerme reir y cambiar mi perspectiva de la vida cotidiana, a mis amigas, Nancy y Marisa por los buenos ratos que reimos juntos.

A Silvia, Liz y Claudia quienes siempre me han apoyado en el Laboratorio y sobre todo me han brindado su amistad.

Al Dr. Martín Talavera Rojas quien ha sido guía en mi formación academica desde la licenciatura, por su paciencia, amistad y gran apoyo.

A la Dra. Jeannette Barba León, ha sido un gran apoyo en mi formación de Maestría, durante mi estancia en el CUCBA y durante la redacción del artículo.

A todos mis amigos, compañeros, conocidos y desconocidos del programa de Maestría, por el simple hecho de conocerlos, en especial a Yahir, por tener la oportunidad de haber sido parte de su formación académica y por su amistad.

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIAS	ii
INDICE.....	iii
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
1. Antecedentes:	4
2. Clasificación y Nomenclatura:	9
3. Mecanismo de acción de los antibióticos:	13
4. Mecanismo de acción de las determinantes de resistencia:	18
5. Epidemiología:	23
III. JUSTIFICACION.....	29
IV. HIPOTESIS	31
V. OBJETIVOS	32
VI. METODOLOGÍA	33
1. MUESTREO:	33
2. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIE:.....	33
3.- PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA:	35
4. DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA:	38
5. ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPOS PULSADOS (PFGE):	41
6.ANALISIS DE RESULTADOS:	46
VII. RESULTADOS	47
VIII. DISCUSIÓN	71
IX. CONCLUSIONES	78
X. SUGERENCIAS	79
XI. LITERATURA REVISADA	80
XII. ANEXOS.....	97

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Esquemas de clasificación y características de las ESBLs/AmpC.....	10
Cuadro 2.	Origen del nombre de las ESBLs.....	10
Cuadro 3.	Origen del nombre de las β -lactamasas pAmpC.....	11
Cuadro 4.	Morfología de las colonias de <i>E. coli</i> en agar McConeky.....	34
Cuadro 5.	Cebadores empleados para la amplificación del gen <i>uidA</i>	35
Cuadro 6.	Antimicrobianos empleados e interpretación de la prueba de difusión con discos.....	36
Cuadro 7.	Antimicrobianos empleados e interpretación de la prueba confirmatoria para ESBLs.....	37
Cuadro 8.	Cebadores empleados para la identificación de genes de resistencia.....	38
Cuadro 9.	Cebadores empleados para la identificación de PMQR.....	39
Cuadro 10	Caracterización de los genes de resistencia antimicrobiana y su patrón de sensibilidad fenotípico.....	68
Cuadro 11.	Distribución geográfica de los genes de resistencia provenientes del Estado de México y Jalisco.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura de los principales antibióticos β -lactámicos (el anillo β -lactámico está marcado por la línea de puntos).....	13
Figura 2.	Similitud del antibiótico β -lactámico a la unidad de D-alanina-D-alanina.....	14
Figura 3	Estructura de las quinolonas (obsérvese la presencia de un átomo de flúor en el caso del norfloxacino y ciprofloxacino).....	15
Figura 4.	Reacciones catalizadas por la ADN girasa y Topoisomerasa IV.....	17
Figura 5.	Estructura de la proteína QnrB1.....	21
Figura 6.	Alineación de secuencias aminoacídicas de diferentes variantes de AAC(6 γ)-Ib incluyendo la variante AAC(6 γ)-Ib-cr, se resalta con amarillo las sustituciones necesarias para conferir resistencia a las fluoroquinolonas.....	22
Figura 7.	Inoculación de las cajas de Petri con el inóculo bacteriano.....	35
Figura 8.	Lectura e interpretación de la prueba confirmatoria de ESBLs.....	37
Figura 9.	Material de laboratorio empleado para la preparación de geles de la PFGE....	43
Figura 10	Equipo empleado para la PFGE, incluyendo la cámara de electroforesis CHEF DRII.....	45
Figura 11	Sensibilidad antimicrobiana de aislamientos de <i>E. coli</i> (n=155). NA: ácido nalidíxico, CIP: ciprofloxacino, AM: ampicilina, CAZ: ceftazidima, CTX: cefotaxima.....	65
Figura 12	Halos de inhibición obtenidos con la prueba confirmatoria para ESBL.....	66
Figura 13	Detección de genes <i>bla</i> _{TEM} y <i>bla</i> _{CMY} Gel de agarosa (2%); M, marcador de peso molecular (Benchtop 100 pb ladder; Promega, Madison WI, USA); Carril 1, <i>E. coli</i> ATCC 25922; Carril 2, 3 y 4, <i>E. coli</i> (<i>bla</i> _{TEM} ⁺); Carril 5, <i>E. coli</i> (<i>bla</i> _{TEM} ⁻); Carril 6, <i>E. coli</i> (<i>bla</i> _{CMY} ⁺).....	67
Figura 14	Detección de genes <i>qnr</i> Gel de agarosa (2%); M, marcador de peso molecular (Benchtop 100 pb ladder; Promega, Madison WI, USA); Carril 1, <i>E. coli</i>	

	ATCC 25922; Carril 2 a 7, <i>E. coli</i> (<i>qnrB</i> +); Carril 5, <i>E. coli</i> (<i>qnrB</i> + y <i>qnrS</i> +).....	67
Figura 15	Imagen de un gel de PFGE. La secuencia de números en la parte superior indica el carril correspondiente a cada uno de los aislamientos analizados y se observa el patrón genotípico generado por la enzima de restricción XbaI. Los carriles encerrados en el marco rojo corresponden a la cepa control <i>Salmonella</i> Braenderup H8912. En el margen izquierdo se observa el peso molecular de las bandas generadas por esta cepa.....	70
Figura 16	Dendograma generado a partir de los geles de PFGE mostrando la relación genotípica de aislamientos de <i>E. coli</i>	70

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AM	Ampicilina
ATCC	Control de cultivo tipo americano
BHI	Infusión cerebro corazón
CAZ	Ceftazidima
CFU	Unidad formadora de colonias
CIP	Ciprofloxacino
CLA	Ácido clavulanico
CLB	Buffer de lisis celular
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio
CSB	Buffer de suspensión celular
CTX	Cefotaxima
EGM	Elementos genéticos móviles
ESBLs	β -Lactamasas de espectro extendido
<i>et al</i>	y colaboradores
ETAs	Enfermedades transmitidas por alimentos
MIC	Concentración mínima inhibitoria
NA	Ácido nalidíxico
pAmpC	β -lactamasas AmpC plasmídicas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis en gel de campos pulsados
PMQR	Resistencia a quinolonas mediada por plásmidos
QRDR	Región determinante de resistencia a quinolonas
SIM	Sulfuro indol movilidad
SUL	Sulbactam
TSA	Agar soya tripticasa
TSI	Hierro tres azúcares
TZB	Tazobactam

RESUMEN

RESISTENCIA A β -LACTÁMICOS Y QUINOLONAS EN AISLAMIENTOS DE *Escherichia coli* OBTENIDOS DE CANALES DE BOVINOS EN EL ESTADO DE MÉXICO Y JALISCO

Aguilar-Montes de Oca S, Talavera-Rojas M, Soriano-Vargas E, Barba-León J

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), especialmente por alimentos de origen animal son un problema vigente que afecta a la población humana. Los microorganismos patógenos responsables de estas enfermedades han desarrollado una gran variedad de mecanismos de resistencia a los antibióticos, entre ellos, destacan las β -lactamasas de espectro extendido (ESBLs), las β -lactamasas AmpC plasmídicas (pAmpC) y la resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (PMQR), capaces de diseminarse por medio de elementos genéticos móviles (EGM) como los plásmidos e integrones y de otorgar resistencia a los antibióticos β -lactámicos y quinolonas, los cuales son ampliamente utilizados para tratar infecciones bacterianas. El objetivo de este estudio fue determinar la resistencia antimicrobiana de 155 aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos de canales de bovino en dos entidades federativas de México (Estado de México y Jalisco). La identificación de los aislamientos se realizó por medio de pruebas bioquímicas y agar MacConkey y se corroboraron mediante una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar el gen *uidA*, el cual es específico para esta especie. Los aislamientos fueron desafiados con antimicrobianos β -lactámicos (ampicilina, ceftazidima y cefotaxima) y quinolonas (ácido nalidíxico y ciprofloxacino). Se determinó la presencia de genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA}, *bla*_{CMY}, *bla*_{MOX}, *bla*_{LAT}, *bla*_{BIL}, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')*-*Ib-cr* y *qepA* mediante PCR. La relación genética de los aislamientos fue determinada mediante electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE). Se observó resistencia para ácido nalidíxico (64%), seguida de la ampicilina (32%), ciprofloxacino (10%), ceftazidima y cefotaxima (ambos 1.3%). Los genes que se detectaron fueron: *bla*_{CMY} (n=1), *bla*_{TEM}

(n=24), *qnrB* (n=11) y *qnrS* (n=7). El análisis de los geles de PFGE mostró que la mayoría de los aislamientos tienen un perfil genotípico diferente, a excepción de dos aislamientos que presentaron un perfil similar. Este es el primer reporte de la presencia de los genes *qnrB*, *qnrS* y *bla_{CMY}* en aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos de carne de bovino en México. El estudio realizado en esta tesis pone en evidencia la presencia de aislamientos de *E. coli* portadores de mecanismos de resistencia transmitidos por plásmidos en productos cárnicos y su probable diseminación en la cadena alimenticia, lo cual constituye un riesgo para la Salud Pública.

Palabras clave: *Escherichia coli*, resistencia antimicrobiana, β -lactámicos, quinolonas.

ABSTRACT

ANTIMICROBIAL RESISTANCE TO β -LACTAMS AND QUINOLONES IN *Escherichia coli* ISOLATES OBTAINED FROM BOVINE CARCASS IN ESTADO DE MEXICO AND JALISCO

Montes de Oca SA, Talavera-Rojas M, Soriano-Vargas E, Barba-León J

The food-borne diseases (ETAs), especially those of animal origin are a current issue affecting the human population. The pathogen microorganisms responsible of these diseases have developed diverse antimicrobial resistance mechanisms, stand among them the extended-spectrum β -lactamases (ESBLs), the plasmidic AmpC β -lactamases (pAmpC) and the plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR), they are capable of spread through genetic mobile elements (EGM) as plasmids and integrons and they grant resistance to β -lactams and quinolones antibiotics, which are widely used to treat bacterial infections. The aim of this study was to determine the antimicrobial resistance of 155 isolates of *Escherichia coli* obtained from bovine carcass in two federal entities of Mexico (Estado de México and Jalisco). The isolates identification was carried out by biochemical tests and MacConkey agar and was corroborated with a polymerase chain reaction test (PCR) to detect *uidA* gene, which is species-specific. The isolates were challenged with β -lactams (ampicillin, ceftazidime and cefotaxime) and quinolones (nalidixic acid and ciprofloxacin) antibiotics. The presence of *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA}, *bla*_{CMY}, *bla*_{MOX}, *bla*_{LAT}, *bla*_{BIL}, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr* and *qepA* genes was detected using PCR. The isolates genetic relatedness was determined by means of pulsed field gel electrophoresis (PFGE). Antimicrobial resistance was observed to nalidixic acid (64%), followed by ampicillin (32%), ciprofloxacin (10%), ceftazidime and cefotaxima (both 1.3%). The *bla*_{CMY} (n=1), *bla*_{TEM} (n=24), *qnrB* (n=11) and *qnrS* (n=7) genes were detected. The PFGE analysis showed that most isolates have a different genetic profile, except two isolates with identical PFGE pattern. This is the first report of *bla*_{CMY}, *qnrB* and *qnrS* genes in isolates of *E. coli* obtained from bovine carcass in Mexico. This thesis highlights the presence of *E. coli*

isolates harboring plasmid-borne antimicrobial resistance mechanisms in meat products and their probably dissemination in the food chain and threatening public health.

Key words: *Escherichia coli*, antimicrobial resistance, β -lactamics, quinolones.

I. INTRODUCCIÓN

Los antibióticos constituyen quizá el grupo de fármacos más exitosos creados para mejorar la salud humana al reducir significativamente la morbilidad y mortalidad causada por diversos microorganismos (Rice, 2008). Además de esta aplicación fundamental, también han sido usados para la prevención y tratamientos de infecciones en animales y plantas, así como promotores de crecimiento en animales destinados al consumo humano (Seiffert *et al.*, 2013; Stockwell y Duffy, 2012).

El empleo de los antibióticos por el hombre ha incrementado su presencia en las poblaciones humanas, animales y en el medio ambiente, lo cual, a su vez, ocasiona una presión selectiva en las poblaciones microbianas lo que ha hecho que los genes de resistencia a determinados antibióticos presentes en el cromosoma bacteriano de varios microorganismos puedan diseminarse mediante elementos genéticos móviles como los plásmidos o integrones, los cuales se distribuyen entre bacterias de diferentes géneros y especies, incluyendo a los microorganismos patógenos para el ser humano (Madigan *et al.*, 2004; Martínez, 2009).

La resistencia antimicrobiana en microorganismos Gram negativos, principalmente de la familia *Enterobacteriaceae* se ha extendido en las últimas décadas gracias a la transferencia horizontal de genes que confiere resistencia a una amplia gama de antibióticos (Livermore, 2012; Martínez, 2009), como las quinolonas y los β -lactámicos (principalmente las cefalosporinas). Estos dos grupos de antimicrobianos destacan por su importancia en la medicina humana y veterinaria para tratar una amplia gama de enfermedades (Hammerum y Heuer, 2009).

La resistencia a los antibióticos β -lactámicos es ocasionada por diferentes mecanismos, de los cuales el más común es la producción de enzimas (β -lactamasas) capaces de hidrolizar e inactivar al antimicrobiano. Actualmente se conocen más de 1000 de estas enzimas (Bush y

Fisher, 2011), aunque algunas son más importantes debido a que están más diseminadas geográficamente o por el sustrato (subclase de β -lactámico) que hidroliza. Son de especial relevancia las β -lactamasas de espectro extendido (ESBLs, por sus siglas en inglés) de las familias TEM, SHV, CTX-M y enzimas del grupo AmpC (Jacoby, 2009; Paterson y Bonomo, 2005).

En el caso de las quinolonas, solamente se conocía la resistencia codificada en el cromosoma del microorganismo resultado de la acumulación de mutaciones en la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR, por sus siglas en inglés), sin embargo, hace poco más de una década se descubrió la resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (PMQR, por sus siglas en inglés) que incluye las proteínas Qnr, la enzima aac(6)-Ib-cr y la bomba de eflujo QepA. Es importante mencionar que dichos mecanismos sólo aumentan levemente la resistencia y por lo tanto, pueden ser indetectables en las pruebas fenotípicas tradicionales, sin embargo, al estar presentes junto con otro mecanismo plasmídico o si hay mutaciones en la QRDR se genera un incremento en la resistencia que es detectable fenotípicamente (Strahilevitz *et al.*, 2009).

Los patógenos transmitidos por alimentos como *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., *Enterococcus faecium* y *Escherichia coli* llegan a portar mecanismos de resistencia que pueden permitir su supervivencia en el ser humano aun cuando se empleen antibióticos. *Escherichia coli* es relevante por el hecho de estar presente en una gran diversidad de hábitats, por lo tanto tiene mayores posibilidades de adquirir genes de resistencia, en especial aquellas cepas patógenas que pueden ocasionar brotes epidémicos (Martinez, 2009).

En los últimos años se ha incrementado el número de publicaciones a nivel mundial que informan sobre la presencia de mecanismos de resistencia a β -lactámicos y quinolonas en aislamientos de origen animal y productos para consumo humano derivados de estos (Carattoli, 2008; Li *et al.*, 2007; Poirel *et al.*, 2012). En México se han publicado algunos

artículos sobre la presencia de ESBL y PMQR en humanos y en el ambiente (Dalkman *et al.*, 2012; Garza-González *et al.*, 2011; Reyna-Flores *et al.*, 2013; Silva-Sanchez *et al.*, 2011), en contraste, sólo se ha publicado un artículo que investigó la presencia de ESBL/AmpC en aislamientos de origen animal y productos alimenticios derivados de estos, y no se ha publicado ningún artículo sobre la presencia de PMQR (Zaidi *et al.*, 2007).

Debido a la importancia para la Salud Pública y la diseminación de mecanismos de resistencia a β -lactámicos y quinolonas en aislamientos provenientes de productos para consumo humano de origen animal, el objetivo del presente estudio fue determinar el nivel de resistencia a estos antibióticos y establecer que genes son los responsables de otorgar tal resistencia en aislamientos de *E. coli* obtenidos de canales de bovinos en el Estado de México y Jalisco.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

1. Antecedentes:

La producción de enzimas β -lactamasas es el principal y más frecuente mecanismo de resistencia a los antibióticos β -lactámicos en microorganismos Gram negativos (Livermore, 2003). En 1940 se identificó la primera β -lactamasa en *Escherichia coli*, este descubrimiento ocurrió antes del uso generalizado de la penicilina, demostrando que estas enzimas estaban presentes en la naturaleza mucho antes de la era de los antibióticos (Bush y Jacoby, 2010).

A principios de la década de los 60s se describió la primera β -lactamasa mediada por plásmidos en un aislamiento de *E. coli* (Gupta, 2007; Harada *et al.*, 2008). A esta β -lactamasa se le denominó TEM-1, y años después se descubrió la variante génica TEM-2. Un segundo tipo de enzimas que aparecieron posteriormente fueron las SHV y la primera enzima caracterizada se llamó SHV-1. Esta primera enzima se encontró en *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* (Rubtsova *et al.*, 2010).

Los genes que codifican ambos tipos de enzimas comúnmente son transmitidos mediante plásmidos en *E. coli* y otras especies bacterianas, aunque los genes para SHV tiene la particularidad de estar codificados también en el cromosoma de *K. pneumoniae*. Estas enzimas han sido encontradas en una gran diversidad de microorganismos en casi todo el mundo (Livermore, 1995; Rubtsova *et al.*, 2010).

Las enzimas TEM-1 y 2 y SHV-1 son altamente activas contra penicilinas y tienen una actividad modesta contra las primeras generaciones de cefalosporinas. A principios de la década de los 80s se emplearon dos nuevas cefalosporinas: la cefotaxima (CTX) y la ceftazidima (CAZ), que son resistentes a la acción de estas β -lactamasas, su aplicación médica permitió contrarrestar las infecciones causadas por microorganismos que producen

estas enzimas (Bonnet, 2004), sin embargo, el incremento en la aplicación clínica provocó que los genes codificantes de las β -lactamasas existentes mutaran y surgieran nuevas enzimas capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas de amplio espectro y monobactámicos. Debido a esta propiedad que les permitía inactivar una gran variedad de antibióticos β -lactámicos se les denominó β -lactamasas de espectro extendido (ESBLs) (Gupta, 2007; Pfaller y Segreti, 2006).

A los pocos años de emplearse generalizadamente la cefotaxima y ceftazidima comenzaron a surgir los primeros reportes de β -lactamasas capaces de hidrolizar cefalosporinas de espectro extendido (Bonnet, 2004). En 1983 se reportó aislamientos de *K. pneumoniae* y *Serratia marcescens* con una nueva enzima capaz de hidrolizar estos antimicrobianos, sus genes, presentes en plásmidos eran similares a SHV-1, por lo tanto se le denominó SHV-2 (Harada *et al.*, 2008).

En 1987 se describió una nueva variante génica de la familia TEM, TEM-3 en aislamientos de *K. pneumoniae* que podía hidrolizar tanto a CAZ como a CTX. Muy pronto se hizo evidente mediante la secuenciación de genes, que las recientes ESBLs que se iban descubriendo eran descendientes de las β -lactamasas TEM-1, TEM-2 y SHV-1 que habían sufrido mutaciones genéticas. (Harada *et al.*, 2008; Pfaller y Segreti, 2006).

En 1988 en Japón, Matsumoto *et al.* informaron de la presencia de una cepa de *E. coli* que era ligeramente más resistente a la cefotaxima que a la ceftazidima. A principios de 1989 en Alemania se informó de la presencia de un aislamiento clínico de *E. coli* que producía una β -lactamasa de espectro extendido que no era TEM o SHV y se denominó CTX-M en referencia a su actividad hidrolítica contra la cefotaxima (Bauernfeind *et al.*, 1989). Durante varios años más se siguió reportando enzimas que tenían propiedades fenotípicas similares (hidrolizaban cefalosporinas de tercera generación) y se les asignaban diferentes nombres (Bonnet, 2004).

En la década de los 90s varios estudios sobre secuenciación de genes revelaron que muchas de las enzimas descritas hasta ese momento eran idénticas o eran variantes del grupo CTX-M (Bauernfeind *et al.*, 1996; Ishii *et al.*, 1995). A partir de entonces esta familia de enzimas ha crecido rápidamente tanto en variantes, distribución geográfica y especies de bacterias de relevancia clínica, especialmente en la familia *Enterobacteriaceae* (Bonnet, 2004; Harada *et al.*, 2008).

Durante las décadas los 80s y 90s las ESBLs TEM y SHV fueron las predominantes a nivel mundial, sin embargo, a partir de 1995 se observó un incremento en el número de enzimas CTX-M y actualmente han desplazado a los otros grupos. Las razones del relativo éxito que han tenido estas enzimas para diseminarse ampliamente son inciertas hasta ahora (Livermore, 2012).

La historia sobre las β -lactamasas AmpC se remota a 1940, siendo la primera enzima que se reportó capaz de hidrolizar la penicilina, aunque en su momento no se le dio ese nombre (Jacoby, 2009). Al principio se encontró que estas enzimas estaban codificadas en el cromosoma de una gran cantidad de microorganismos (incluyendo enterobacterias) como *Acinetobacter spp.*, *Aeromonas spp.*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp.*, *E. coli*, *Hafnia alvei*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. marcescens* y *Yersinia enterocolitica*, entre otras. En el caso de *E. coli* el gen codificante de esta enzima suele estar presente, sin embargo, tiene la característica de expresarse a un nivel bajo y por lo tanto no es suficiente para generar una resistencia importante incluso para la ampicilina (Philippon *et al.*, 2002).

Las enzimas β -lactamasas AmpC empezaron a tener mayor importancia en la década de los 70s y 80s, años en los cuales se descubrió que sus genes estaban transmitiéndose a través de plásmidos, y pronto se detectaron en diferentes ambientes a nivel mundial (Bauernfeind *et al.*, 1989; Bobrowski *et al.*, 1976). Uno de los primeros reportes de aislamientos de origen

animal portando estas enzimas fue el de Fey *et al.*, en el año 2000 en los Estados Unidos, los aislamientos eran de *Salmonella* Typhimurium y provenían de ganado bovino.

En cuanto a la resistencia a las quinolonas, se debe recordar que su uso clínico comenzó en 1962 con el ácido nalidíxico, un antimicrobiano sintético con efecto bactericida para la mayoría de las enterobacterias (Tillotson, 1996). Innovaciones farmacológicas permitieron tiempo después el desarrollo de las fluoroquinolonas que estuvieron disponibles clínicamente en la década de los 80s (Robicsek *et al.*, 2006a).

El descubrimiento de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (PMQR, por sus siglas en inglés) lo realizaron Martínez-Martínez *et al.* en 1998 con aislamientos clínicos de *K. pneumoniae*; siendo el gen que codificaba la resistencia a quinolona *qnrA1*, desde entonces, nuevas variantes génicas de este grupo se describieron.

En 2005 Hata *et al.* publicaron el descubrimiento de otro gen *qnr* presente en *Shigella flexneri* durante una epidemia por intoxicación alimentaria en Japón. El gen se denominó *qnrS* y tenía un 59% de similitud con *qnrA*. En 2006 Jacoby *et al.* describieron otro gen similar presente en cepas de *K. pneumoniae* en la India, lo nombraron *qnrB*.

Wang *et al.* (2009) publicaron el hallazgo de un nuevo gen al que nombraron *qnrC* y se encontró en cepas de *Proteus mirabilis*. Ese mismo año, Cavaco *et al.* reportaron el último miembro de este grupo de genes que se conoce hasta la fecha, *qnrD*, el cual se encontró en cepas de *Salmonella enterica* serovar Bovismorbificans y Kentucky aislados de humanos en China.

Poco después del descubrimiento de las proteínas *qnr* se observó que no todos los plásmidos portadores de este gen transferían el mismo nivel de resistencia a quinolonas, dicha variación demostró ser causada por otro gen de resistencia transferible que puede reducir la susceptibilidad a las quinolonas y que no pertenece a la familia de proteínas *qnr*;

los estudios mostraron que se trataba de una variante de las enzimas aminoglucósido acetiltransferasas (AAC(6^γ)-Ib) que confieren resistencia a antibióticos aminoglucósidos como la amikacina y tobramicina, y confiere una resistencia baja hacia las quinolonas como el ciprofloxacino y norfloxacino (Robicsek *et al.*, 2006b).

En general, se ha informado que el gen codificante se encuentra principalmente en aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae*, sin embargo, la AAC(6^γ)-Ib-cr se descubrió por primera vez en aislamientos de origen animal en microorganismos del género *Aeromonas* spp. y en especies animales no domésticas (animales de zoológico) en Japón (Ahmed *et al.*, 2007).

Otro mecanismo de resistencia a quinolonas es una bomba de eflujo que fue descrita por primera vez por Yamane *et al.* (2007) en aislamientos clínicos humanos de *E. coli* de Japón. Ese mismo año otro estudio en Bélgica informó sobre la presencia de esta bomba de eflujo (Périchon *et al.*, 2007). En ambos estudios se demostró que el gen de este mecanismo de resistencia estaba codificado en plásmidos. En el año 2008 Cattoir *et al.*, documentaron la presencia de una variante de esta bomba de eflujo que confiere un perfil de resistencia similar, por lo que se les renombró como QepA1 y QepA2.

El primer reporte de QepA en animales fue en aislamientos de *E. coli* obtenidos de cerdos en China, se encontró que se expresaba junto con otros mecanismos PMQR como qnr y AAC(6^γ)-Ib-cr. Un segundo estudio realizado en ese mismo país mostro que esta bomba de eflujo también estaba presente en animales de compañía y en aislamientos de *K. pneumoniae* y *E. cloacae* (Liu *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2009).

2. Clasificación y Nomenclatura:

a) a) ESBL/AmpC:

Actualmente hay dos esquemas ampliamente utilizados para clasificar a las β -lactamasas; uno está basado en las características funcionales de las enzimas (clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros) y el otro es un esquema molecular (clasificación de Ambler) que se basa en la secuencia de aminoácidos. El modelo molecular clasifica a las β -lactamasas en cuatro clases moleculares: A, B, C y D. Las enzimas de la clase A, C y D emplean serina para hidrolizar β -lactámicos, mientras que las metaloenzimas que conforman la clase B requieren iones de zinc como substrato. Las ESBL pertenecen a la clase A y D, mientras que las AmpC pertenecen a la clase molecular C (Ambler, 1980).

La clasificación funcional se basa en la capacidad de estas enzimas para hidrolizar determinados β -lactámicos y en su susceptibilidad a otros, como los inhibidores de β -lactamasas, entre los que destacan el ácido clavulánico (CLA), sulbactam (SUL) o tazobactam (TZB). En este esquema existen tres grupos de β -lactamasas: cefalosporinasas (Grupo 1), serina β -lactamasas (Grupo 2) y metalo- β -lactamasas (Grupo 3), y a su vez, dichos grupos se pueden dividir en subgrupos. La mayoría de las ESBLs de las familias TEM, SHV y CTX-M pertenecen al subgrupo 2, mientras que la mayoría de enzimas AmpC pertenecen al grupo 1 (Bush y Jacoby, 2010) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Esquemas de clasificación y características de las ESBLs/AmpC

Clasificación molecular	Clasificación funcional	Substrato distintivo	Inhibido por		Características	Enzimas típicas
			CA o TZB*	EDTA		
C	1	Cefalosporinas	No	No	Mayor hidrolisis de cefalosporinas que de bencilpenicilinas	CMY-2, MIR-1
A	2be	Cefalosporinas de espectro extendido y monobactamicos	Si	No	Hidrolisis de oximino- β -lactámicos (cefotaxima, ceftazidima, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15

*CA, ácido clavulánico; TZB, tazobactam

(Tomado y modificado de Bush y Jacoby, 2010)

En cuanto a los nombres de las β -lactamasas, a estas se les asignaban el nombre de la cepa o el plásmido en el que se encontraban. Posteriormente la nomenclatura ha sido más creativa, los nombres provienen del sustrato, propiedades bioquímicas, peculiaridades de la secuencia, lugar de descubrimiento, localización del gen en el cromosoma, nombre del paciente del cual se aisló la muestra o el nombre del investigador (Jacoby, 2006). El origen de los nombres de las enzimas TEM, SHV y CTX-M se muestra en el Cuadro 2 (donde las letras oscuras muestran las iniciales empleadas):

Cuadro 2. Origen del nombre de las ESBLs

Nombre de la β -lactamasa	Origen del nombre
TEM	Derivado del nombre del paciente (Tem oneira) del cual se obtuvo el aislamiento portador de esta enzima.
SHV	Contracción del inglés “ sulf hydryl reagent v ariable” que describe sus propiedades bioquímicas.
CTX-M	Descripción de su actividad sobre la cefotax ima, primer aislamiento en M unich

(Tomado y Modificado de Jacoby, 2006)

La familia CTX-M se puede dividir de acuerdo a la similitud en su secuencia de aminoácidos, se han determinado 5 grupos principales de estas enzimas: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25 (Bonnet, 2004; Pitout *et al.*, 2005).

Las β -lactamasas plasmídicas AmpC (pAmpC) han sido nombradas de manera inconsistente de acuerdo a la su resistencia hacia diferentes β -lactámicos, lugar de descubrimiento o nombre de un paciente (Cuadro 3).

Cuadro 3. Origen del nombre de las β -lactamasas pAmpC

Nombre de la β -lactamasa	Origen del nombre
CMY	Resistencia a cefamicinas (del inglés cepham ycins)
FOX	Resistencia a cefox itina
MOX	Resistencia a mox alactam
LAT	Resistencia a lat amoxef
MIR-1	Descubierta en el Hospital Miriam en Providencia, R.I.
DHA	Descubierto en el Hospital Dhahran en Arabia Saudi
BIL-1	Derivado del nombre del paciente (Bilal) del cual se obtuvo el aislamiento portador de esta enzima.

(Tomado y modificado de Jacoby, 2006 y Philippon *et al.*, 2002)

Una investigación en la cual se mejoró la secuenciación nucleotídica de diferentes enzimas mostró que la secuencia de LAT-2 era idéntica a la de CMY-2 y BIL-1, LAT-3 era idéntica a CMY-6, mientras que LAT-4 era idéntico a LAT-1, no obstante, los nombres persisten en la literatura (Barlow y Hall, 2002).

b) Qnr:

La designación de genes *qnr* viene del inglés “quinolone resistance”. El término inglés “resistance” denota o se refiere a un incremento en la concentración mínima inhibitoria (CMI) (Robicsek, 2006a).

Jacoby *et al.* (2008) propusieron una nomenclatura para agrupar a los diferentes genes *qnr* y en la cual establecieron varios criterios como el que una nueva familia debe diferir sustancialmente de otras (se sugiere una diferencia de $\geq 30\%$ en la secuencia de nucleótidos o aminoácidos derivados) o que una o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos defina un nuevo alelo. Dentro de cada familia se observa una variación menor de $\leq 10\%$ en las secuencias. Para las familias *qnrA* y *qnrS* el número de variantes es fácilmente manejable, sin embargo, el número de alelos de la familia *qnrB* se ha incrementado y con ellos el problema de su clasificación.

Bajo los criterios de la clasificación de Jacoby *et al.* (2008) y la base de datos de la página web <http://www.lahey.org/qnrStudies> actualmente hay 5 grupos de genes *qnr* con sus respectivas variantes: *qnrA* (7 variantes), *qnrB* (52 variantes), *qnrC* (1 variante), *qnrD* (1 variante) y *qnrS* (6 variantes). Algunas de estas variantes génicas no han sido todavía publicadas o son comunicaciones personales.

c) AAC(6)-Ib-cr:

Aunque esta enzima tiene la característica de afectar a las quinolonas su secuencia nucleotídica y su estructura proteínica corresponde al de las enzimas modificadoras de aminoglucósidos, por lo que se clasifica dentro de este grupo. El nombre proviene de aminoglucósido acetiltransferasa (abreviado “aac”), seguido de un número en paréntesis para designar el sitio de acción de la actividad enzimática sobre la molécula del aminoglucósido. Esto puede ser seguido por un número romano para indicar el perfil de

resistencia fenotípica particular que exhibe, en el caso de las AAC(6^γ) se subdivide en dos grupos AAC(6^γ)-I y AAC(6^γ)-II. También se asigna una letra minúscula (“a, b, c, etc.”) que sirve como identificador para reconocer una variante particular (Ramírez y Tolmasky, 2010; Ramírez *et al.*, 2013). Finalmente, a esta variante se le agregaron las letras “cr” (del inglés “ciprofloxacin resistance”) para referirse a su capacidad de afectar a ciertas quinolonas como el ciprofloxacino (Robicsek *et al.*, 2006b).

d) QepA:

El nombre QepA proviene de las palabras en inglés “**quinolone efflux pump**” denotando la capacidad de este elemento transmitido por plásmidos para otorgar resistencia específica a las quinolonas. Los estudios realizados sobre este mecanismo de resistencia muestra que pertenecen a una de las cinco familias que se conocen de bombas de eflujo, la superfamilia facilitadora mayor (MFS, por sus siglas en inglés) (Yamane *et al.*, 2007).

3. Mecanismo de acción de los antibióticos:

a) β-lactámicos:

Este grupo lo componen principalmente las penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos. Todos estos antibióticos tienen una estructura característica, el anillo β-lactámico (Figura 1). Es uno de los grupos de antibióticos mejor conocidos y con un amplio

Group	Structure
Penicillins	
Cephalosporins	
Monobactams	
Carbapenems	

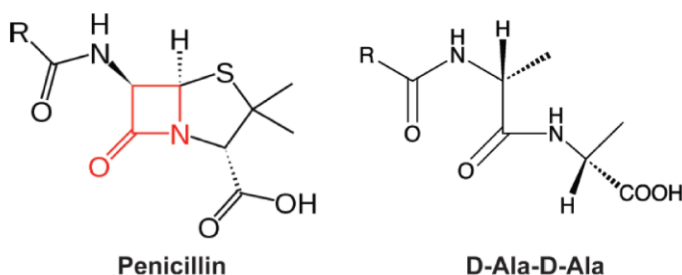
Figura 1. Estructura de los principales antibióticos β-lactámicos (el anillo β-lactámico está marcado por la línea de puntos) (Tomado de Rubtsova *et al.*, 2010)

uso en la medicina humana y veterinaria debido a su selectividad, versatilidad y baja toxicidad (Prescott, 2007). Las penicilinas y las cefalosporinas constituyen alrededor de la mitad de todos los antimicrobianos que se producen en el mundo (Madigan *et al.*, 2004).

Los antibióticos β -lactámicos son potentes inhibidores de la síntesis de la pared celular, específicamente, inhiben la síntesis de peptidoglucano. La pared bacteriana de las bacterias Gram negativas está compuesta por cadenas de glucanos, que son fibras lineales con unidades alternas de *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetilmurámico unidas lateralmente. Un pentapéptido se une a cada unidad de ácido *N*-acetilmurámico y al final de este se encuentra una unidad de D-alanina que se entrecruza con otra unidad de D-alanina del pentapéptido adyacente de otra cadena de glucanos mediante una reacción de transpeptidación (Madigan *et al.*, 2004; Martín-Jiménez, 2002).

La reacción de transpeptidación es la responsable del entrecruzamiento de las fibras peptídicas, lo que confiere a la pared bacteriana la estabilidad necesaria. Las enzimas que realizan este paso son las transpeptidasas, endopeptidasas y carboxipeptidasas, estas enzimas se denominan proteínas de unión a penicilina (PBPs, del inglés “penicillin binding proteins”) y son capaces de unirse a los antibióticos que tengan un anillo β -lactámico; esto se debe a que el anillo β -lactámico es similar a la unidad de D-alanina-D-alanina por lo que “equivocadamente” las PBPs lo emplean para construir la pared celular (Figura 2) (López y Camberos, 2006).

Figura 2. Similitud del antibiótico β -lactámico a la unidad de D-alanina-D-alanina



(Tomado de Zeng y Lin, 2013)

Las PBP se unen fuertemente a los β -lactámicos y ya no pueden catalizar la reacción de transpeptidación, la pared celular continúa formándose pero su estructura se debilita progresivamente de tal forma que no soporta la presión del medio interior bacteriano y se rompe durante el proceso de división celular, conduciendo a la bacteriolisis (Martín-Jiménez, 2002).

En los microorganismos Gram positivos el grosor de la pared bacteriana es aproximadamente 50 veces superior al de los microorganismos Gram negativos. Sin embargo, la capa bilipídica externa de los microorganismos Gram negativos es más difícil de atravesar, es por eso que la mayoría de las penicilinas de primera generación sólo son activas contra Gram positivos, sin embargo, posteriormente surgieron antimicrobianos como la amoxicilina, ampicilina y las cefalosporinas cuyo espectro también abarca las bacterias Gram negativas (López y Camberos, 2006 Martín-Jiménez, 2002).

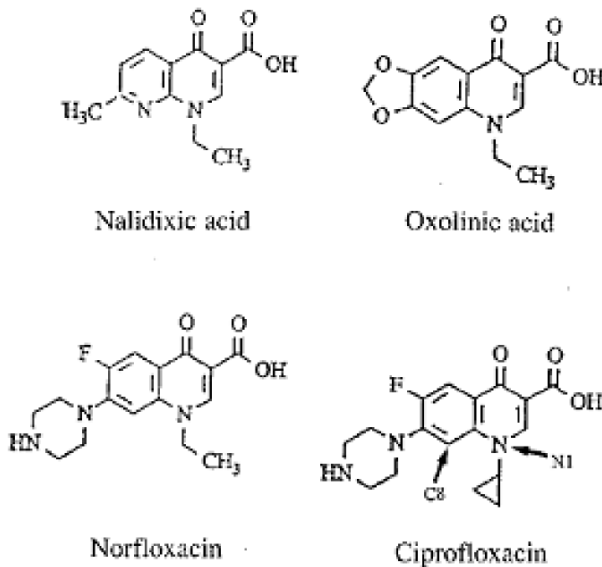


Figura 3. Estructura de las quinolonas (obsérvese la presencia de un átomo de flúor en el caso del norfloxacin y ciprofloxacin) (Tomado de Drlica y Zhao, 1997)

b) Quinolonas:

Es un grupo de fármacos sintéticos empleados ampliamente en Medicina Humana y Veterinaria (Hopkins, *et al.*, 2005; Poirel *et al.*, 2012; Weber y Piddock, 2001). La primera generación de quinolonas comienza con el ácido nalidíxico en 1962, seguido de otros como el ácido oxolínico o el ácido pipemídico (Poirel, *et al.*, 2012). Sus aplicaciones clínicas son escasas debido a su distribución limitada en el organismo y un estrecho margen de

actividad antimicrobiana. (Tilloston, 1996; Walker y Dowling, 2007).

Posteriormente se modificó la estructura molecular de las quinolonas al introducir un átomo de flúor (Tilloston, 1996), dando origen a las fluoroquinolonas o quinolonas de segunda generación como el norfloxacin, ofloxacin, pefloxacin, ciprofloxacino o el enrofloxacin, capaces de alcanzar mayores niveles séricos y con una actividad antimicrobiana amplia contra bacterias Gram negativas, algunas bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y bacterias intracelulares (Ball, 2000; Poirel *et al.*, 2012) (Figura 3).

La generación más reciente de fluoroquinolonas incluye el levofloxacin y el moxifloxacin que presentan una mayor actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas (como *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina) y el trovafloxacin, gatifloxacin o gemifloxacin que actúan contra bacterias anaeróbicas e incluso otros patógenos atípicos de las vías respiratorias como *Chlamydia pneumoniae* o *Mycoplasma pneumoniae* (Ball, 2000; Poirel *et al.*, 2012; Walker y Dowling, 2007).

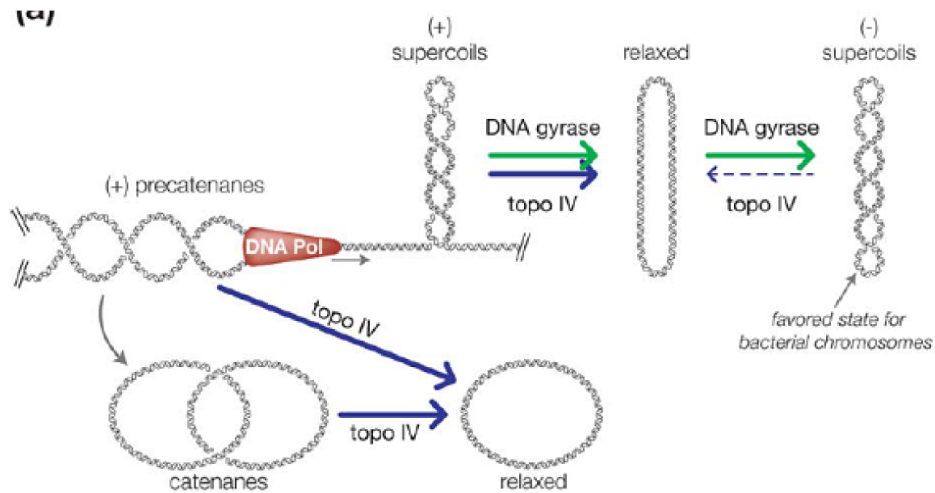
E. coli, al igual que otros microorganismos produce enzimas llamadas ADN topoisomerasas que controlan la topología del ADN cromosomal y facilitan la replicación celular (Drlica y Zhao, 1997). Al contrario de las topoisomerasas tipo I que transitoriamente rompen una cadena de la doble hélice de ADN, las topoisomerasas tipo II rompen momentáneamente ambas cadenas y permiten el paso de otro segmento de doble cadena a través de la ruptura para después volver a unir las secciones separadas (Poirel *et al.*, 2012).

Las quinolonas actúan sobre dos de estas enzimas bacterianas esenciales, la ADN girasa y la ADN topoisomerasa IV (ambas topoisomerasas tipo II). La girasa controla el superenrollamiento negativo en la doble cadena de ADN (Drlica y Zhao, 1997); esta enzima es un tetrámero compuesta por 2 subunidades proteicas GyrA y 2 subunidades

GyrB (complejo A₂B₂) que son codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*, respectivamente, en el genoma bacteriano (Hawkey, 2003; Walker y Dowling, 2007) (Figura 4).

La topoisomerasa IV es una enzima homologa de la ADN girasa que está conformada por dos subunidades ParC y dos subunidades ParE, codificadas por los genes *parC* y *parE*, respectivamente (Hawkey, 2003; Hooper, 2000). Esta enzima actúa en las etapas finales de la replicación del ADN al facilitar la decatenación (separación) de los cromosomas para que estos puedan segregarse en las células hijas (Drlica y Zhao, 1997; Hooper, 2000) (Figura 4).

Figura 4. Reacciones catalizadas por la ADN girasa y Topoisomerasa IV



(Tomado de Corbett *et al.*, 2005)

Ambas enzimas poseen particularidades que las diferencian entre sí, la girasa es la única enzima bacteriana capaz de introducir superenrollamientos negativos, mientras que la topoisomerasa IV está involucrada en la relajación dependiente de ATP del ADN y su capacidad para decatenar el ADN es mucho más potente que la girasa. Otra diferencia es que la girasa al interactuar con el ADN envuelve a este último alrededor de sí misma, cuestión que no ocurre con la topoisomerasa IV, (Drlica y Zhao, 1997).

Algunos estudios sugieren que las quinolonas tienen como objetivo primario la girasa en bacterias Gram negativas como *E. coli*, mientras que en bacterias Gram positivas como *S. aureus* y *S. pneumoniae* la enzima más susceptible es la topoisomerasa IV (Blanche *et al.*, 1996; Hoshino *et al.*, 1994; Khodursky *et al.*, 1995), sin embargo, este hecho también parece ser influenciado por la estructura química particular de cada una de las fluoroquinolonas (Pan y Fisher, 1997).

Las quinolonas actúan al unirse a la girasa o topoisomerasa IV e inducir un cambio conformacional en estas enzimas. La enzima realiza su función al romper la cadena de ADN, pero las quinolonas previenen su posterior unión. Se forma un complejo de ADN-quinolona-enzima que ocasionan la escisión de la doble cadena de ADN y evita su reparación y por lo tanto la replicación bacteriana mediante una inhibición de la síntesis de ADN y disminuye la síntesis de ARN (Hawkey, 2003; Walker y Dowling, 2007).

4. Mecanismo de acción de las determinantes de resistencia:

a) β - Lactámicos:

La hidrólisis de los antibióticos β -lactámicos por parte de las β -lactamasas es el mecanismo más común de resistencia para esta clase de agentes antibacterianos y generalmente se les asocia con microorganismos Gram negativos (Bush y Jacoby, 2010). Las ESBLs se han reportado frecuentemente en aislamientos de *Escherichia coli* y en *Klebsiella*, aunque también se han encontrado en otras especies como *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Serratia marcescens* (Pfaller y Segreti, 2006; Turner, 2005).

En general las cepas portadoras de ESBLs permanecen susceptibles a las cefamicinas (cefotitina) y carbapenems (Pfaller y Segreti, 2006). Las ESBLs TEM y SHV mantienen su

actividad contra penicilinas y cefalosporinas, además hidrolizan una o más oximino-cefalosporinas como cefotaxima, ceftazidima y aztreonam (Bush y Jacoby, 2010).

Las enzimas CTX-M usualmente confieren resistencia a las aminopenicilinas (ampicilina o amoxicilina), carboxipenicilinas (carbenicilina o ticarcilina), ureidopenicilinas (piperacilina) y cefalosporinas de espectro reducido (cefalotina, cefaloridina y cefuroxima). La mayoría de estas enzimas otorga resistencia a las oximino-cefalosporinas cefotaxima y ceftriaxona pero frecuentemente son susceptibles a la ceftazidima, la resistencia a la cefepima y cefpiroma es variable. En general son susceptibles a inhibidores de β -lactamasas (clavulanato, sulbactam y tazobactam) (Bonnet, 2004). Característicamente, este grupo permanece sensible a la inhibición por ácido clavulónico, una característica empleada en su detección por laboratorios clínicos (Bush y Jacoby, 2010).

Las enzimas CTX-M no están relacionadas estrechamente a las β -lactamasas TEM y SHV, en su lugar, muestran un alto grado de homología con las β -lactamasas tipo AmpC codificadas en el cromosoma de especies del género *Kluyvera*, lo que sugiere que las β -lactamasas CTX-M son variantes genéticas descendientes de este grupo de enzimas (Pfaller y Segreti, 2006).

Los genes que codifican las enzimas CTX-M se encuentran comúnmente en plásmidos que varían de tamaño desde 7 Kb a 160 Kb. Estos plásmidos pueden también portar genes de resistencia a otros antibióticos como aminoglucósidos, fenicoles, tetraciclinas, etc. otorgando a la bacteria la propiedad de multiresistencia (Bonnet, 2004).

Otras β -lactamasas tienen características diferentes, por ejemplo, las β -lactamasas OXA se han encontrado con mayor frecuencia en *P. aureginosa* que en miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Hidrolizan penicilinas y cloxacilinas más que cefalosporinas de tercera generación y la mayoría son resistentes a los inhibidores de β -lactamasas (Pfaller y Segreti, 2006).

b) Quinolonas:

El principal mecanismo de resistencia en la familia *Enterobacteriaceae* es la acumulación de mutaciones en los genes que codifican las enzimas bacterianas que son blanco de las fluoroquinolonas: la ADN girasa y la ADN topoisomerasa IV (Robicsek, 2006a). Dichas mutaciones ocurren con mayor frecuencia en una región de los genes que se conoce como la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR, por sus siglas en inglés) (Hawkey, 2003).

De manera normal, las quinolonas se unen a estas enzimas y estabilizan un complejo ADN-quinolona-enzima que ocasionan roturas de la doble cadena de ADN, sin embargo, las mutaciones en la QRDR, alteran la unión de la quinolona a la estructura protéica, disminuyendo su capacidad para formar el complejo ADN-quinolona-enzima y ocasionando la resistencia a estos antimicrobianos (Hopkins *et al.*, 2005).

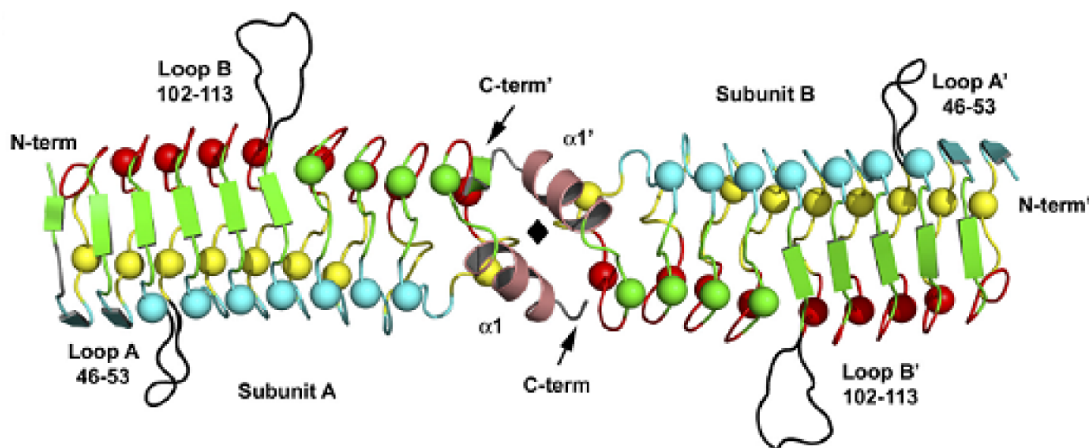
El otro mecanismo clásico de resistencia funciona disminuyendo la acumulación intracelular del fármaco mediante una sobrerregulación de bombas de eflujo ya sean solas o en conjunto con disminución de la expresión de las porinas de la membrana externa. Ambos mecanismos de resistencia son mutacionales, se incrementan en un organismo individual y son transmitidos verticalmente a la progenie que sobreviva. Al parecer, ninguno de los dos mecanismos puede transmitirse efectivamente a través de elementos genéticos móviles (Fábrega *et al.*, 2008).

Las proteínas Qnr pertenecen a la familia de proteínas de pentapéptidos repetidos, la cual está conformada por una secuencia de 5 aminoácidos repetidos aleatoriamente. La proteína Qnr es un dímero, es decir, una proteína compuesta por dos subunidades idénticas. Las 2 subunidades se unen en un modulo de dimerización en sus extremos carboxilo (extremo C-terminal) que consiste en una estructura $\beta/\alpha/\beta$ y cada subunidad tienen una conformación espacial de una hélice β (estructura conformada por hojas β en un patrón helicoidal)

cuadrilátera (tiene 4 caras en las cuales se distribuyen los pentapéptidos repetidos) y dextrógira. A lo largo de cada subunidad sobresalen dos bucles (A y B, respectivamente) (Figura 5) (Strahilevitz *et al.*, 2009; Xiong *et al.*, 2011; Vetting *et al.* 2011).

Actualmente se desconoce el mecanismo exacto mediante el cual la proteína Qnr protege la ADN girasa y topoisomerasa IV; se han propuestos dos teorías: Xiong *et al.* (2011) propusieron que los bucles juegan un papel importante para inhibir el efecto de las quinolonas, su modelo muestra que el bucle A interacciona con la superficie externa de la subunidad GyrB de la enzima ADN girasa, mientras que el bucle B toca la superficie de GyrA, de esta manera la proteína Qnr “protege” a la ADN girasa del efecto de las quinolonas. La otra teoría propone que la proteína Qnr reacciona a concentraciones submicromolares de antibiótico y se une y desestabiliza el complejo quinolona-topoisomerasa, causando la separación de la quinolona y permitiendo nuevamente la religación y liberación del ADN (Vetting *et al.* 2011).

Figura 5. Estructura de la proteína QnrB1



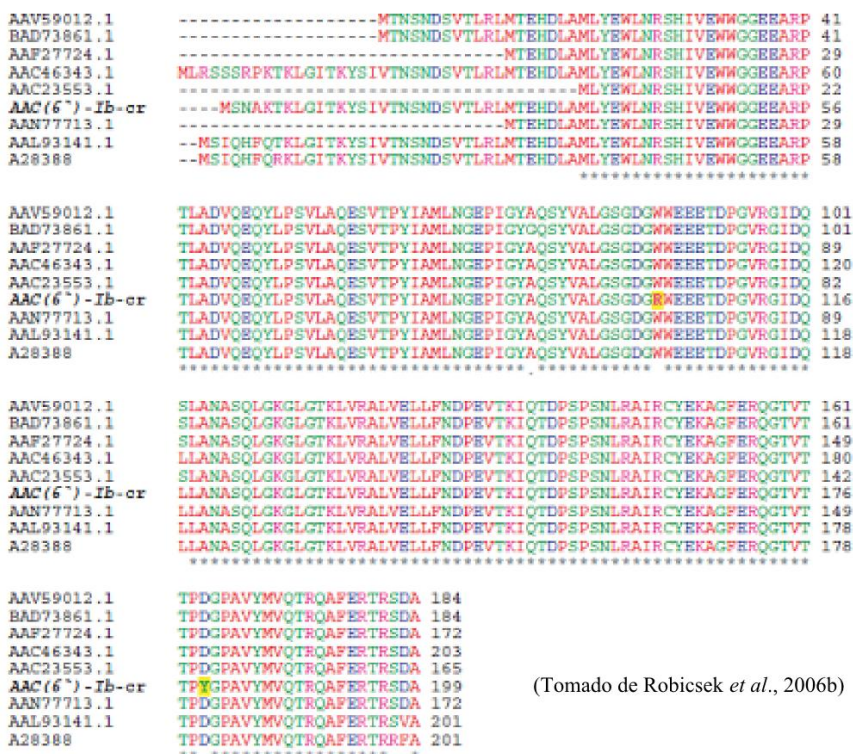
(Tomado de Vetting *et al.*, 2011)

En general, la adquisición de un plásmido portador de un gen *qnr* o de otro gen de PMQR confiere un ligero aumento a la resistencia a quinolonas; normalmente por debajo del punto

de ruptura para clasificar a los aislamientos como no susceptibles según el criterio del CLSI. Los genes *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* confieren una resistencia similar al comparar cada uno de ellos de manera separada. A grandes rasgos, estos genes ocasionan un incremento de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de 2 a 8 veces para el ácido nalidíxico y de 8 a 32 veces para el ciprofloxacino (Strahilevitz *et al.*, 2009).

Aun a pesar de las similitudes entre las MIC de los aislamientos portadores de estos genes se han descrito varios factores que ocasionan variaciones en el nivel de resistencia como puede ser mutaciones en la región QRDR o la presencia adicional de otros mecanismos de resistencia en algunos plásmidos, el número de copias del gen, o el nivel de transcripción de los genes *qnr* (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007).

Figura 6. Alineación de secuencias aminoacídicas de diferentes variantes de AAC(6´)-Ib incluyendo la variante AAC(6´)-Ib-cr, se resalta con amarillo las sustituciones necesarias para conferir resistencia a las fluoroquinolonas.



(Tomado de Robicsek *et al.*, 2006b)

El gen *aac(6')-Ib-cr* codifica una variante de la enzima aminoglucósido acetiltransferasa (AAC(6')-Ib, que usualmente confiere resistencia a la tobramicina, amikacina y kanamicina. Esta variante posee 2 sustituciones en los codones 102 (Trp→Arg) y 179 (Asp→Tyr) en comparación con otras secuencias del mismo gen, las cuales son necesarias y suficientes para generar un fenotipo de resistencia al ciprofloxacino (Figura 6); aun así, el incremento en la MIC de este antibiótico es menor que el que confieren las proteínas Qnr (incremento de la MIC de 2 a 4 veces) (Robicsek *et al.*, 2006b).

La enzima AAC(6')-Ib-cr es capaz de acetilar (introducir un grupo acetilo a un compuesto químico) con mayor eficiencia a los aminoglucósidos que a las quinolonas. La acetilación ocurre en el nitrógeno amino en el sustituyente piperazinil, por lo que solo aquellas fluoroquinolonas que portan un grupo piperazinil (como el ciprofloxacino y norfloxacino) son un sustrato adecuado para esta enzima, otras quinolonas que carecen de este grupo no son afectadas (Robicsek *et al.*, 2006b).

5. Epidemiología:

Los genes de β -lactamasas más frecuentemente documentados en aislamientos de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de espectro extendido en humanos son (de mayor a menor): *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-14} y *bla*_{CMY-2}. En contraste, en animales destinados al consumo humano las enzimas más frecuentes son CTX-M-1 (14-100%, siendo común en aislamientos obtenidos de bovinos y cerdos), seguido de la variante CTX-M-14 (11-66%) y CMY-2 (13-78%) (Ewers *et al.*, 2012; Seiffert *et al.*, 2013). Gran parte de la información sobre la presencia de estos genes de resistencia proviene de países europeos y Norteamérica, mientras que en países de Asia, Sudamérica y África la información es escasa, sin embargo, actualmente ya existen algunos estudios en estos países (Ewers *et al.*, 2012).

En Estados Unidos los genes predominantes que confieren resistencia a los antibióticos β -lactámicos en *E. coli* aislado de animales incluyen a *bla*_{TEM-1}, *bla*_{PSE-1}, *bla*_{CMY-2} (Glenn *et al.*, 2012). De especial relevancia es *bla*_{CMY-2} al ser la β -lactamasa AmpC más diseminada, encontrándose en algunos casos una frecuencia de 80% en cerdos y de 95% en bovinos (Chander *et al.*, 2011; Donaldson *et al.*, 2006).

Otro estudio realizado con aislamientos de *E. coli* de Estados Unidos y España recolectados en clínicas y en carne de cerdo, pollo y bovinos mostró que en España predominaban las enzimas CTX-M y SHV, mientras que en Estados Unidos se encontró sólo un aislamiento portando un gen CTX-M, mientras que el resto portaban el gen *bla*_{CMY-2} siendo este el más frecuente en ese país (Doi *et al.*, 2010).

En Asia, los tres principales países que han publicado artículos sobre la presencia de ESBL/pAmpC en aislamientos de *E. coli* obtenidos de bovinos son China, Corea y Japón (Seiffert *et al.*, 2013). En China Zheng *et al.*, 2012 encontró que las únicas β -lactamasas presentes en aislamientos de origen bovino fueron CTX-M-14 y CTX-M-55. Otro estudio en Corea encontró que las principales β -lactamasas también fueron CTX-M-14 y CTX-M-55 (Ho *et al.*, 2011). Finalmente un estudio realizado en Japón encontró β -lactamasas CTX-M-2 y CMY-2 (Asai *et al.*, 2011).

En Europa también existen varios trabajos publicados. Egervärn *et al.* (2013) investigaron su presencia en carne importada en Suecia, encontrando una frecuencia de 0-8% en muestras provenientes de carne de bovino, 2-13% en cerdo y 15-95% en pollos de engorda, siendo dominantes los genes *bla*_{CMY-2}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2} y *bla*_{CTX-M-8} dependiendo del país del cual provenía la muestra.

En general, se observa una frecuencia mayor de genes *bla*_{CTX-M} en aislamientos de *E. coli* de Europa y una menor cantidad de genes pAmpC, por ejemplo, Dolejska *et al.*, 2011 encontraron que en una granja lechera el único gen confiriendo resistencia a cefalosporinas

de tercera generación fue *bla*_{CTX-M-1} (100%). En Francia, dos estudios realizados por el mismo autor trabajando con aislamientos provenientes de bovinos de carne en granja y en planta de faenado, revelaron la presencia de genes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM} y *bla*_{OXA} (Madec *et al.*, 2008; Madec *et al.*, 2012).

Se ha documentado la presencia de los genes *qnr* en aislamientos de *E. coli* y *Salmonella* spp de origen animal, las tres principales familias detectadas de estos genes son *qnrA*, *B* y *S*. En Europa se han hallado en cerdos y pollos (Szmolka *et al.*, 2011), en Asia se ha reportado principalmente en aves de corral (Kim *et al.*, 2013), en América también existen artículos informando sobre su presencia en pollos en Brasil y Estados Unidos (Ferrari *et al.*, 2011; Ponce-Rivas *et al.*, 2011) y África (Fortini *et al.*, 2011). También se han encontrado genes *qnr* en otras especies animales menos estudiadas como cabras (Filioussis *et al.*, 2013) y caballos (Schink *et al.*, 2012).

En el caso de la frecuencia de genes *qnr* en aislamientos de *E. coli* de origen bovino, existe un menor número de artículos en contraste con la gran cantidad de información sobre la frecuencia de β -lactamasas. Se ha informado sobre su presencia en Turquía (Cengiz *et al.*, 2012), en casos clínicos de mastitis en vacas lecheras de Egipto (Ahmed y Shimamoto, 2011), y finalmente, un estudio en Reino Unido mostró la presencia de la variante *qnrS1*, junto con un gen *bla*_{CTX-M} aunque ubicados en diferente plásmido (Kirchner *et al.*, 2011).

En cuanto a los otros dos mecanismos de PMQR (*aac(6')-Ib-cr* y *qepA*) también existen varios artículos que muestran su presencia junto con los genes *qnr* en aislamientos de origen animal. La presencia del gen *aac(6')-Ib-cr* ha sido reportado en aves de corral de Australia (Ingram *et al.*, 2013), animales y productos comerciales derivados de estos en Corea (Koo y Woo, 2012), también se ha reportado en aislamientos de *K. pneumoniae* y *E. coli* en granjas psicológicas de Egipto (Ishida *et al.*, 2010) y pollos en Japón (Kawanishi *et al.*, 2013). Un menor número de artículos han detectado este gen en aislamientos provenientes

de bovinos o productos derivados de estos como carne y leche (Ahmed *et al.*, 2009; Ahmed y Shimamoto, 2011; Madec *et al.*, 2012).

El gen *qepA* se ha descubierto en aislamientos de *E. coli* de origen animal, algunos de estos estudios incluyen aislamientos obtenidos de cerdos y pollos principalmente, uno de ellos se realizó en Nigeria, mientras que otro artículo menciona la presencia de este gen en China (Fortini *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2012).

Muchos estudios recientes se han centrado en detectar aislamientos que portan genes que codifican ESBL, AmpC o PMQR al mismo tiempo. Dichos estudios han mostrado la transmisión de estos mecanismos de resistencia en cerdos (Huang *et al.*, 2012), peces (Jiang *et al.*, 2012) y pollos (Veldman *et al.*, 2012). Cabe destacar que China parece ser el país que presenta hasta el momento el mayor número de estudios en los cuales han estado presentes diferentes mecanismos de resistencia que afectan la viabilidad tanto de los antibióticos β -lactámicos y quinolonas, como ejemplo se puede citar los estudios en ese país realizados por Chen *et al.*, 2012 y Xu *et al.*, 2014.

Otro aspecto importante es la epidemiología molecular con la que podemos determinar la relación filogenética de los aislamientos resistentes a antibióticos y poder determinar si su similitud sugiere que sean clonas que se han estado diseminando en la población animal o humana o entre estas. Algunas investigaciones que han empleado la PFGE han asociado la presencia de aislamientos resistentes en las poblaciones animales con casos clínicos de enfermedades. Por ejemplo, Fey *et al.*, (2000) informaron sobre una infección gastrointestinal causada por *Salmonella enterica* resistente a cefalosporinas de tercera generación (ceftriaxona) en un niño de 12 años de edad en los Estados Unidos, cuya familia tenía un hato lechero que también presentó un cuadro clínico de diarrea causado por *Salmonella enterica*. Al comparar los perfiles genéticos de los aislamientos mediante PFGE se observó similitudes en su patrón de bandas, lo que sugería la transmisión del agente patógeno del bovino hacia la persona, además de ambos poseían el gen *bla_{CMY}*.

Otro trabajo realizado en Estados Unidos con aislamientos clínicos y de animales destinados a consumo humano (bovinos, pollos, cerdos y pavos) de *Salmonella* spp. demostró que 16 de 20 de los patrones de PFGE más frecuentes en aislamientos clínicos humanos también se encontraban en aislamientos de origen animal, especialmente de pollos, sugiriendo que el consumo de carne de esta especie constituye un factor de riesgo para adquirir salmonelosis (Sandt *et al.*, 2013). En México, Zaidi *et al.*, 2007 encontraron similitudes entre varios patrones de PFGE de aislamientos de *Salmonella* Typhimurium aislados en humanos con aislamientos principalmente de carne e intestino de porcinos.

En México, el estudio sobre las ESBL se remonta a la década de los 90s cuando se comenzó a caracterizar fenotípica y genotípicamente aislamientos resistentes a CAZ y CTX (Silva-Sánchez y Aguilar-Zacarías, 1997; Silva *et al.*, 1999). Actualmente se sabe sobre la presencia de ESBL de la familia TEM, SHV y CTX-M en diferentes especies de enterobacterias, principalmente *K. pneumoniae* y *E. coli* en ocasiones, asociados a PMQR, del cual se han reportado las tres familias de proteínas qnr (qnrA, B y S), AAC(6)-Ib-cr y qepA (Garza-González *et al.*, 2011; Morfín-Otero *et al.*, 2013; Muro *et al.*, 2012; Reyna-Flores *et al.*, 2013; Silva-Sanchez *et al.*, 2011).

En el caso del grupo de las β -lactamasas AmpC plasmídicas, sólo se ha reportado la presencia de la familia CMY (específicamente la variante CMY-2) en México en aislamientos de *Salmonella* Typhimurium (Zaidi *et al.*, 2007). Otro grupo de β -lactamasas que también se han encontrado en México son la familia OXA en aislamientos de *P. aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* (Higgins *et al.*, 2013; González-Villa *et al.*, 2012); TLA-1, es una β -lactamasa que hasta el momento sólo se ha encontrado en nuestro país (Alcantar-Curiel *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2000; Silva-Sanchez *et al.*, 2011) y finalmente, otras enzimas de las familias GES, VIM e IMP presentes en aislamientos de *P. aeruginosa* (Castillo-Vera *et al.*, 2012; González-Villa *et al.*, 2012; Sanchez-Martínez *et al.*, 2010).

Todos los estudios realizados hasta la actualidad han sido principalmente sobre aislamientos de origen nosocomial y algunos de origen comunitario, sin embargo, son escasos los artículos sobre estas enzimas en aislamientos de origen animal o productos alimenticios derivados de estos; el único trabajo publicado en nuestro país es el de Zaidi *et al.*, 2007 donde se tomaron muestras de intestino y carne de bovino, cerdo y pollo, encontrando únicamente la β -lactamasa AmpC plasmídica CMY-2, y no existen estudios similares sobre la presencia de PMQR.

III. JUSTIFICACION

Es indudable el gran aporte de los antibióticos a la humanidad: millones de vidas han sido salvadas a lo largo de la historia y hasta la actualidad constituyen nuestra primera línea de defensa contra las enfermedades causadas por bacterias. Debido a que se han desarrollado pocos antimicrobianos nuevos u otros mecanismos novedosos que sean más efectivos, es importante tomar conciencia de su importancia y estudiar más sobre el modo adecuado de aplicarlos.

La resistencia antimicrobiana es un evento que ha ocurrido desde antes del descubrimiento de los antibióticos, por lo tanto, se puede afirmar que es un fenómeno dinámico y constante a lo largo del tiempo, sin embargo, la intervención humana genera cambios en la interacción bacteria-antibiótico.

En últimos años la comunidad científica internacional ha encontrado nuevos genes y variantes genéticas que otorgan resistencia a antibióticos β -lactámicos y quinolonas, y se ha puesto especial énfasis en *Escherichia coli* de origen animal destinados para consumo humano que presenten estos genes, además de la posibilidad de que dichos genes estén en un mismo plásmido, con el subsecuente riesgo de diseminarse a otras especies bacterianas; este fenómeno que actualmente es infrecuente constituye quizá una de las mayores amenazas a la salud pública, pues significaría limitar a dos grupos de agentes quimioterapéuticos claves en el tratamiento de enfermedades infecciosas.

El uso de β -lactámicos como las cefalosporinas (ceftiofur) y fluoroquinolonas (enrofloxacino) en Medicina Veterinaria y otros antimicrobianos que se administran en premezclas, inevitablemente ocasionan la aparición de aislamientos resistentes en la microbiota intestinal de rumiantes que pueden transmitirse al ser humano a través de alimentos contaminados o bien, diseminarse al medio ambiente por medio de las excretas. Ambos casos constituyen una amenaza para la Salud Pública.

Es necesario determinar qué genes de resistencia a β -lactámicos y quinolonas existen en las poblaciones animales destinadas al sacrificio por varias razones: 1) Nos permite tener una idea general del estado actual de la resistencia a antibióticos en animales de abasto, lo cual nos posibilita establecer medidas para contrarrestar este efecto, como la alternancia entre diferentes grupos de antimicrobianos o limitar su uso en premezclas, 2) Es útil para comparar los perfiles filogenéticos y la diseminación de clones que pudieran estar circulando entre animales y humanos a través de la cadena alimenticia, además pudiera ser especialmente relevante cuando se quiera relacionar un brote epidemiológico en la población humana causada por un agente patógeno portador de ESBL y genes *Qnr* cuyo medio de transmisión sean productos cárnicos contaminados, 3) Podemos detectar la presencia de alguna nueva variedad genética de estas enzimas que sean de relevancia médica.

En México se han hecho investigaciones encaminadas a determinar genes de resistencia para β -lactámicos y quinolonas, no obstante, dichos estudios se han centrado casi exclusivamente en aislamientos de seres humanos y se ha rezagado la información de resistencia a estos antibióticos en animales, sobre todo aquellos destinados al consumo humano. Por lo anterior, es necesario para la Medicina Veterinaria que se conozcan los genes de resistencia presentes para que se implementen medidas adecuadas y específicas para prevenir la diseminación de cepas resistentes.

Debido a la importancia de los antibióticos β -lactámicos y quinolonas tanto en Medicina Veterinaria como Medicina Humana es necesario realizar y reportar la frecuencia de genes que codifican las enzimas SHV, TEM, CTX-M y *Qnr* en aislamientos procedentes de canales de bovino en México y qué tan diseminados están en esta especie, además de poder observar cuál de ellos es más frecuente y el riesgo que representan para la Salud Pública.

IV. HIPOTESIS

Los aislamientos de *E. coli* aisladas de canales de bovinos en el Estado de México y Jalisco presentan resistencia antimicrobiana a los antibióticos β -lactámicos y quinolonas codificadas por los genes de β -Lactamasas de Espectro Extendido y PMQR.

V. OBJETIVOS

General

- Determinar la resistencia antimicrobiana a los antibióticos β -lactámicos y quinolonas de aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos de canales de bovinos en el Estado de México y Jalisco.

Específicos:

- Determinar la resistencia fenotípica de los aislamientos de *E. coli* aislados de canales de bovinos a quinolonas y β -lactámicos.
- Confirmar la presencia de β -lactamasas de espectro extendido (ESBLs).
- Identificar la presencia de genes de resistencia en aislamientos de *E. coli* aislados de canales de bovinos asociados a β -lactamasas (familia CTX-M, SHV o TEM) y quinolonas (*qnr*).
- Determinar los genotipos de los aislamientos de *E. coli* obtenidos de canales de bovinos resistentes a quinolonas y β -lactámicos.

VI. METODOLOGÍA

1. MUESTREO:

Se emplearon 155 aislamientos de *E. coli* provenientes de diferentes ceparios en dos entidades federativas de México: 75 aislamientos provenientes del Estado de México; 56 aislamientos de canales y heces de bovinos provenientes de tres rastros municipales (Montes de Oca, 2011; Reyes-Rodríguez *et al.*, 2013); 12 aislamientos de plantas procesadoras de alimento (rastros TIF) (Fuentes-Arriaga *et al.*, 2013) y 7 aislamientos recolectados de carne molida provenientes de carnicerías que fueron aislados e identificados en el CIESA (Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal). Los 80 aislamientos de *E. coli* obtenidos de canales de bovinos en rastros municipales de Jalisco fueron recolectados en conjunto durante un estudio diseñado para estudiar la frecuencia de aislamientos de *Salmonella* (Perez-Montaña *et al.*, 2012).

2. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIE:

a) Identificación fenotípica:

Los aislamientos de *E. coli* empleados para este estudio se encuentran almacenados a -80°C en caldo infusión cerebro corazón (BHI) o caldo soya tripticasa con glicerol. Se procedió a una siembra en caldo BHI y posteriormente se estirió en agar McConkey y se observó la morfología y color característico de este microorganismo en el medio selectivo (Cuadro 4):

Cuadro 4: Morfología de las colonias de *E. coli* en agar McConeky

<i>E. coli</i> (lactosa positivo)	Colonias rojas-rosas, usualmente rodeadas de un precipitado biliar, de 2-3 mm de diámetro
<i>E. coli</i> (lactosa negativo)	Colonias incoloras, de 2-3 mm de diámetro

(Tomado y modificado de Farmer, 1999)

Aquellos aislamientos de los cuales se tenía duda sobre la morfología de la colonia se les realizó las siguientes pruebas bioquímicas: TSI, Citrato de Simmons, Urea y SIM. La preparación de los medios y su interpretación se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (BIOXON™) y Farmer, 1999.

b) Identificación genotípica:

Los resultados de las pruebas fenotípicas se corroboraron a través de la amplificación del gen *uidA* mediante PCR con cebadores previamente diseñados y evaluados (Heijnen y Medema, 2006; Maheux et. al., 2009). Los cebadores y condiciones del PCR se enlistan en el Cuadro 5. La extracción de ADN para todas las reacciones de PCR empleadas en este trabajo se realizaron mediante la técnica de ebullición (Anexo 1).

Se tomaron 2µL de ADN y se adicionaron a una mezcla de PCR que contenía Buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.4 mM de cada cebador, 200 mM de cada trifosfato desoxirribonucleósido, 1U de Taq Polimerasa (Promega, Madison, WI, USA). La mezcla de PCR fue sometida a los siguientes ciclos térmicos: 3min a 95°C, seguido de 30 ciclos de 30s a 95°C, 30s a 60°C, 30s a 72°C, con una extensión final de 5min a 72°C en un termociclador Multigene™ Mini Personal (Labnet International Inc., Edison, NJ, USA). El producto obtenido de la amplificación fue analizado en un gel de agarosa al 2% a 110V por 30 min conteniendo 0.05 mg/L de bromuro de etidio.

Cuadro 5: Cebadores empleados para la amplificación del gen *uidA*

Gen	Primer	Secuencia del primer	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
<i>uidA</i>	UAL1939b	5'-ATGGAATTTCGCCGATTTTGC-3'	187	Heijnen y Medema, 2006
	UAL2105b	5'-ATTGTTTGCCTCCCTGCTGC-3'		

3.- PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA:

a) Prueba de difusión con discos:

La sensibilidad antimicrobiana se evaluó mediante una prueba de difusión con discos. Se preparó un inóculo bacteriano de cada aislamiento en tubos de ensaye con caldo Mueller Hinton (MH) con un patrón de turbidez de 0.5 en la escala de McFarland lo que equivale aproximadamente de 1 a 2×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC). *E. coli* ATCC® 25922 se empleo como cepa control; se introdujo un hisopo estéril de algodón y se sumergió completamente en el tubo de ensaye, antes de retirarlo se escurrió sobre las paredes del tubo para retirar el exceso de líquido del mismo (CLSI, 2012a).

Para inocular las placas de Petri con agar MH, se estrió el hisopo con la suspensión de bacteria sobre toda su superficie en forma paralela y compacta, este paso se repitió dos veces más



Figura 7. Inoculación de las cajas de Petri con el inóculo bacteriano (Fuente: Montes de Oca, 2011)

rotando la placa aproximadamente 60 grados cada vez para asegurar una distribución constante del inóculo, finalmente se barrió el hisopo sobre el borde de la placa; cada caja inoculada se dejó secar durante 2-3 min. La inoculación individual de las placas de Petri se realizó en un período no mayor a 15 min (CLSI, 2012a) (Figura 7).

Dentro de 15 minutos después de que las placas de Petri fueron inoculadas, se procedió a colocar los sensidiscos (Cuadro 6) con una pinza estéril o con un dispensador, asegurándose de que hicieran contacto con la superficie del agar. Después se invirtieron las placas de Petri y se incubaron por 18 h a 35 ± 2 °C (CLSI, 2012a). La lectura se hizo midiendo el diámetro del halo de inhibición en mm con un vernier. Los aislamientos se clasificaron como susceptibles (S), intermedios (I) o resistentes (R) de acuerdo a los estándares del CLSI (CLSI, 2012b) (Cuadro 6).

Cuadro 6: Antimicrobianos empleados e interpretación de la prueba de difusión con discos

Agente antimicrobiano	Abreviación	Contenido del sensidisco (μg)	Criterio interpretativo del diámetro del halo de inhibición (mm)		
			S	I	R
Acido nalidíxico	NA	30 μg	≥ 19	14-18	≤ 13
Ciprofloxacino	CIP	5 μg	≥ 21	16-20	≤ 15
Ampicilina	AM	10 μg	≥ 17	14-16	≤ 13
Ceftazidima	CAZ	30 μg	≥ 21	18-20	≤ 17
Cefotaxima	CTX	30 μg	≥ 26	23-25	≤ 22

(Tomado y modificado de CLSI, 2012b)

b) Prueba confirmatoria para ESBLs:

Los aislamientos que fueron clasificados como resistentes (R) a la CAZ o a la CTX en la prueba de difusión se les realizaron una prueba de discos en combinación para confirmar la detección fenotípica de ESBL; se usaron sensidiscos de CAZ y CTX solos y en

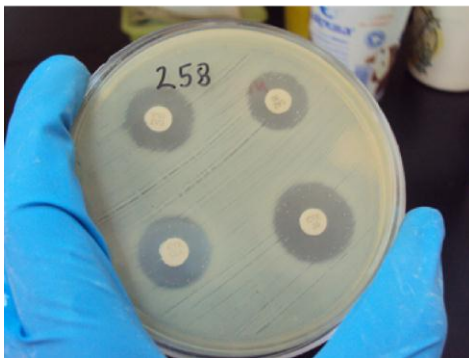
combinación con ácido clavulánico (CLA, 10 µg) (Figura 8). La elaboración del medio MH, inóculo y condiciones de incubación fueron iguales a la prueba de difusión con discos ya descrita. Los sensibilizadores empleados y la interpretación se observan en el Cuadro 7.

Cuadro 7: Antimicrobianos empleados e interpretación de la prueba confirmatoria para ESBLs

Agente antimicrobiano	Abreviación	Contenido del sensibilizador (µg)	Criterio interpretativo del diámetro del halo de inhibición (mm)
Ceftazidima	CAZ	30 µg	Se debe observar un incremento en el halo de inhibición de ≥ 5 mm para cualquiera de los antimicrobianos que está en combinación con el ácido clavulánico en comparación al halo de inhibición del antimicrobiano individual.
Ceftazidima-ácido clavulánico	CAZ/CLA	30/10 µg	
Cefotaxima	CTX	30 µg	
Cefotaxima-ácido clavulánico	CTX/CLA	30/10 µg	

(Tomado y modificado de CLSI, 2012b)

Figura 8. Lectura e interpretación de la prueba confirmatoria de ESBLs (Fuente: Datos originales)



En ambas pruebas la metodología e interpretación de resultados fue de acuerdo a las directrices del CLSI, empleando como cepa control *E. coli* ATCC 25922 (CLSI, 2012b).

4. DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA:

a) Detección de genes *bla*ESBL y *bla*AmpC:

Los aislamientos fueron sometidos a una serie de pruebas de PCR para la detección de los genes que codifican a las ESBLs. Se realizó un PCR múltiple para detectar variantes de los genes *bla*TEM, *bla*SHV y *bla*OXA. Un PCR múltiple para el grupo *bla*CTX-M, otro PCR múltiple para detectar *bla*MOX, *bla*CMY, *bla*LAT y *bla*BIL. Finalmente, un PCR simple para detectar variantes similares a *bla*OXA-48 con cebadores y condiciones de amplificación previamente publicados (Dallene *et al.*, 2010) (Cuadro 8).

Cuadro 8: Cebadores empleados para la identificación de genes de resistencia para β -lactamasas

β -lactamasas	Cebador	Secuencia (5' → 3')	Amplicón (pb)
TEM	MultiTSO-T_for	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	800
	MultiTSO-T_rev	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	
SHV	MultiTSO-S_for	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	713
	MultiTSO-S_rev	ATCCCGCAGATAAATCACCAC	
OXA	MultiTSO-O_for	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	564
	MultiTSO-O_rev	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	
CTX-M-1	MultiCTXMGp1_for	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA ^b	688
	MultiCTXMGp1-2_rev	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT ^b	
CTX-M-2	MultiCTXMGp2_for	CGTTAACGGCACGATGAC	404
	MultiCTXMGp1-2_rev	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT ^b	
CTX-M-9	MultiCTXMGp9_for	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	561
	MultiCTXMGp9_rev	TGATTCTCGCCGCTGAAG	
MOX, CMY	MultiCaseMOX_for	GCAACAACGACAATCCATCCT	895
	MultiCaseMOX_rev	GGGATAGGCGTAACTCTCCCAA	
LAT, BIL, CMY	MultiCaseCIT_for	CGAAGAGGCAATGACCAGAC	538
	MultiCaseCIT_rev	CGAAGAGGCAATGACCAGAC ^b	

OXA-48	MultiOXA-48_for	GCTTGATCGCCCTCGATT	281
	MultiOXA-48_rev	GATTTGCTCCGTGGCCGAAA	

^b Y= T o C; R= A o G; S= G o C; D= A, G o T.

(Tomado y modificado de Dallene *et al.*, 2010)

El ADN total (2µl) fue empleado para cada PCR múltiple en una mezcla reactiva de 50 µl que contenía 1x PCR buffer (10mM de Tris-HCL, pH 8.3/50 mM KCL/1.5 mM MgCl₂), 200 µM de cada trifosfato de desoxinucleotido, 1-2 µl de cebadores y 1U de Taq polimerasa. La amplificación se realizó de la siguiente manera: una desnaturalización inicial a 94°C por 10 min; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 40 s, alineación a 60°C por 40 s y una elongación a 72°C por 1 min; y una elongación final a 72°C por 7 min. Todos los PCR se realizaron con los mismos ciclos de amplificación, excepto para las variantes similares a OXA-48 donde la temperatura óptima de alineación fue 57°C. Los PCR se observaron en un transiluminador después de correrlos a 100 V por 1h en un gel de agarosa al 2% visualizándoles con bromuro de etidio. Se empleo un marcador de 100 pb (Dallene *et al.*, 2010).

b) Detección de genes de PMQR:

Se realizó un PCR múltiple para detectar los genes *qnr* (familia *qnrA*, *qnrB* y *qnrS*) y dos PCR simples para detectar los genes *aac (6')-Ib-cr* y *qepA*. Todas las pruebas se llevaron a cabo con cebadores ya establecidos (Cuadro 9).

Cuadro 9: Cebadores empleados para la identificación de PMQR

Gen	Cebadores	Secuencia (5'→3')	Amplicón (pb)	Referencia
<i>QnrA</i>	QnrAm-F	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	580	Cattoir <i>et al.</i> ,
	QnrAm-R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC		

<i>QnrB</i>	QnrBm-F	GGMATHGAAATTCGCCACTG ^a	264	2007
	QnrBm-R	TTTGCYGYCYGCCAGTCGAA		
<i>QnrS</i>	QnrSm-F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	428	
	QnrSm-R	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG		
<i>aac(6')-Ib</i>	aac(6')-Ib-F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482	Park <i>et al.</i> , 2006
	aac(6')-Ib-R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT		
<i>qepA</i>	QEPA-F	GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG	199	Yamane <i>et al.</i> ,2008
	QEPA-R	CTTCCTGCCCGAGTATCGTG		

^aM= A o C; H= A o C o T; Y = C o T.

El ADN total (2 µl) se adicionó a una mezcla de 50 µL conteniendo 1x PCR buffer (10 mM Tris-HCL, pH 8.3, 50 mM de KCL), 1.5 mM MgCl₂, 200 µM de cada trifosfato de desoxinucleotido, 20 pmol de cada cebador y 2.5 U de Taq polimerasa para todas las reacciones que emplearon los cebadores del cuadro 9.

La amplificación para el PCR múltiple de genes *Qnr* se realizó de la siguiente manera: 10 min a 95°C (desnaturalización inicial) y 35 ciclos de amplificación de 1 min a 95°C (desnaturalización), 1 min a 54°C (alineación) y 1 min a 72°C (elongación); y 10 min a 72°C para la extensión final. (Cattoir *et al.*, 2007).

En el caso del gen *aac(6')-Ib* las condiciones de PCR fueron 34 ciclos a 94°C por 45 s, 55°C por 45 s y 72°C por 45 s (Park *et al.*, 2006). Finalmente, para el gen *qepA* las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 96°C por 1 min, seguido de 30 ciclos de amplificación a 96°C por 1 min, alineación a 60°C por 1 min, y extensión a 72°C por 1 min. La extensión final fue a 72°C por 5 min (Yamane *et al.*, 2008). Los productos de PCR se examinaron en un gel de agarosa al 2% a 100V por 1h conteniendo 0.05 mg/L de bromuro de etidio.

5. ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPOS PULSADOS (PFGE):

Para determinar los genotipos de los aislamientos resistentes a quinolonas y β -láctamicos se empleo la técnica de electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) de acuerdo a lo establecido por la red internacional de PULSENET. La preparación de los reactivos empleados esta en el Anexo 2. La cepa *Salmonella Braenderup* H8912 se empleo como control y marcador de peso molecular. El protocolo se realizó a lo largo de 4 días de la siguiente manera:

a) Día I:

Los aislamientos analizados fueron inoculados en cajas de petri con Agar Soya Trypticasa (TSA). Se estrió con un hisopo de algodón en toda la caja de tal manera que hubiera un crecimiento confluyente de bacteria. Se incubaron las cajas a 37°C durante 18 h. Se preparó una solución stock de proteinasa K (20 mg/mL) y se conservó en viales de 1.5 mL a -20°C.

b) Día II:

Antes de empezar a procesar las muestras se prepara la agarosa para los bloques de la siguiente manera:

- 0.125 g de agarosa
- 0.625 μ L de SDS al 20%
- 11.75 mL de buffer TE

Se mezcló agitando ligeramente y se conservó en una incubadora a 50°C. Posteriormente se procedió a marcar tubos de ensayo de vidrio estériles de 12x75 mm sin tapa con el número de aislamiento y con una micropipeta se le adicionaron 2 mL de buffer de suspensión celular (CSB) a cada tubo. Con un hisopo estéril se tomó el cultivo

bacteriano y se depositó en el tubo de ensayo, se procede a agitar con el vortex ligeramente sosteniendo el hisopo dentro del tubo.

Se ajustó la concentración de suspensión celular con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 610 nm y una absorbancia (densidad óptica) en un rango de 1.4 a 1.425. Para ajustar correctamente la concentración de suspensión celular se diluyó con CSB o se adicionaba el cultivo dependiendo de la lectura del espectrofotómetro.

Una vez ajustada la concentración de suspensión celular de todos los aislamientos se procedió a sellar con cinta la parte inferior de los peines reutilizables para moldear la agarosa en “bloques” y se marcaron las paredes del peine para identificar cada aislamiento. Se realizó una mezcla de los siguientes elementos en viales de 1.5 mL:

- 130 μ L de muestra suspendida
- 6.5 μ L de la solución stock de proteinasa K (previamente descongelada y agitada en el vortex)
- 130 μ L de agarosa

Todos los compuestos se mezclaron suavemente con una micropipeta evitando que se formen burbujas. Inmediatamente se dispensó con la micropipeta parte de la mezcla en las paredes del peine evitando que se formaran burbujas dentro de éste, se adiciona un poco más de agarosa que sobresalga de la parte superior del peine formando un “copete”. Se hicieron 2 “bloques” por cada aislamiento para realizar una posible repetición posterior. Se dejó solidificar los “bloques” a temperatura ambiente por 15 min.

Se prosiguió a realizar la lisis celular de los bloques de agarosa, para lo cual se emplearon tubos Falcon estériles de 50 mL que contenían 7.5 mL de buffer de lisis celular (CLB) y 25 μ L de proteinasa K. Se les rotuló para identificar a que aislamiento correspondían. Se tomó el peine que contiene los bloques de agarosa y se cortó el

exceso de agarosa o “copete” que sobresalía en su parte superior con una navaja, después se retiró la cinta de la parte inferior del peine y con un broche simple para archivo se retiró con cuidado cada bloque de agarosa depositándolo en los tubos Falcon. En cada tubo Falcon se depositaron los dos bloques de agarosa de cada aislamiento, a continuación fueron puestos sobre un agitador dentro de una incubadora por 2 h a 54-55 °C. Mientras tanto se puso a baño maría con agua ultrapura estéril y buffer TE a 54-55 °C.

Una vez concluidas las dos horas se realizaron los lavados de los bloques de agarosa a través de los siguientes pasos:

1. Primero se desechó el CLB con ayuda de unas rejillas de plástico adaptables a los tubos Falcon evitando que se tiren los bloques de agarosa.
2. Se adicionaron 15 mL de agua estéril previamente calentada (54-55 °C) a cada tubo y se volvieron a colocar sobre el agitador en la incubadora a una temperatura de 54-55 °C durante 20 min.
3. Se desechó el agua estéril con la rejilla de plástico y se repitió el paso 2 una vez más.
4. Se desechó el agua estéril y se adicionó buffer TE previamente calentado (54-55 °C) y se colocaron sobre el agitador en la incubadora a una temperatura de 54-55 °C durante 20 min.
5. Se desechó el buffer TE y se repitió el paso 4 tres veces más.
6. Finalmente se desechó el último lavado y se adicionaron 15 mL de buffer TE a los tubos Falcon, almacenándolos a 4°C hasta que volvieron a ser empleados.



Figura 9. Material de laboratorio empleado para la preparación de geles de la PFGE. (Fuente: Datos originales)

c) Día III:

Los bloques de agarosa almacenados un día antes se colocaron sobre una caja de Petri y con cuidado se cortaron pequeñas rebanadas de aprox. 3 mm de longitud. Entre cada corte de diferente aislamiento se realizó una limpieza con alcohol de la navaja y la caja de Petri. La rebanada con mejor textura se seleccionó y se colocó en un tubo de 1.5 mL. A continuación se realizó una mezcla de pre-restricción:

- 178 μ L de agua ultrapura estéril
- 20 μ L de buffer MULTI-CORE (Promega)
- 2 μ L de albúmina de suero bovino acetilada (Promega)

Todos los reactivos se mezclaron con la micropipeta y se incubaron a 37°C por 10 min, se retiró la mezcla con la micropipeta y se procedió a realizar la restricción con los siguientes reactivos por cada rebanada de agarosa:

- 177.5 μ L de agua ultrapura estéril
- 20 μ L de buffer MULTI-CORE (Promega)
- 2 μ L de albúmina de suero bovino acetilada (Promega)
- 2.5 μ L de enzima de restricción XbaI

La mezcla se incubó durante 2 h a 37°C, después se desechó el líquido y se le adicionaron 200 μ L de buffer TBE 0.5X por 5 min y se desechó. La elaboración del gel para la electroforesis se realizó aprox. media hora antes de terminar la restricción enzimática empleando 1 g de agarosa para 100 mL de buffer TBE 0.5X que fue calentado en un microondas y almacenado en una incubadora a 50°C para mantenerlo en estado líquido.

Se armó el molde para el gel de agarosa y se aseguró que estuviera sobre una superficie nivelada para obtener una distribución uniforme del gel. Se colocó el peine de manera horizontal y con cuidado se colocaron las rebanadas de gel de cada muestra en cada uno

de los dientes del peine, en los dientes de los extremos izquierdo y derecho del peine se colocaron rebanadas de la cepa control *Salmonella* Braenderup H8912. Se dejaron secar durante 5 min y posteriormente se acomodó el peine de manera vertical en el molde, asegurándose que las rebanadas estuvieran alineadas al fondo de los dientes del peine y que estuviera al ras de la superficie del molde.

Se retiró la agarosa de la incubadora y se vertió en el molde para el gel y se dejó solidificar durante 30 min aprox., una pequeña porción de agarosa se conservó en la incubadora para llenar los espacios de los dientes del peine una vez que el gel solidificó y se retiró el peine. Posteriormente, se retiró el molde dejando sólo la base y se eliminó con un pañuelo de papel los excesos de agarosa en las orillas y el fondo de la base.

Aproximadamente 30 min antes de realizar la electroforesis del gel se adicionaron 7 L de TBE 0.5X al modulo de refrigeración, el cual fue encendido y ajustado para alcanzar una temperatura de 15°C, además se encendió la fuente de alimentación y la bomba para que comenzara a circular el TBE hacia la cámara de electroforesis. Para realizar la electroforesis se mantiene el gel sobre su base y se coloca en la cámara y se cierra la tapa de ésta.

Se encendió el equipo CHEF DRII (Figura 10) y se programaron las condiciones de electroforesis de la siguiente manera:

- Tiempo inicial: 2.2. s
- Tiempo final: 63.8 s
- Voltaje: 6 V
- Tiempo: 21 h



Figura 10. Equipo empleado para la PFGE, incluyendo la cámara de electroforesis CHEF DRII (Fuente: Datos originales)

d) Día IV:

Una vez finalizado el tiempo programado (21 h) se apago el equipo, se removió el gel y se colocó en un recipiente que contenía bromuro de etidio ($30\mu\text{l}/200\text{ mL}$ de agua destilada) para teñirlo durante 1 h a 100 rpm en un agitador de balanceo (rocker), una vez finalizado el tiempo se retiró el bromuro de etidio y se adicionó 200 mL de agua destilada y se volvió a colocar en el rocker durante 30 min. Finalmente, se retiró el agua y se analizó el gel mediante un fotodocumentador.

Para la interpretación de los patrones de banda que se obtuvieron se creó una matriz binaria de “0” y “1”, para representar la presencia o ausencia de la banda y la matriz fue introducida en el software NTSYSpc versión 2.2, donde la relación de los genotipos se determinó con el algoritmo de vínculos medios usando el método de grupos pares no ponderados (UPGMA) y se calculó la semejanza de las bandas con el coeficiente de Dice. Finalmente, con el programa se generó un dendograma en donde se agruparon los genotipos por clados.

6. ANALISIS DE RESULTADOS:

El análisis de los resultados se realizó mediante estadística descriptiva ordenando los datos obtenidos en tablas y gráficas con el fin de facilitar la interpretación de la información.

VII. RESULTADOS

ARTÍCULO:

Journal of Food Protection: Notification of co-authorship on manuscript (Determination of Extended Spectrum β -Lactamases/AmpC β -Lactamases and Plasmid Mediated Quinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolates Obtained from Bovine Carcasses in Mexico)

Dear Saul Aguilar-Montes de Oca,

You are receiving this E-mail because you have been listed as an author on a manuscript recently submitted to the Journal of Food Protection entitled "Determination of Extended Spectrum β -Lactamases/AmpC β -Lactamases and Plasmid Mediated Quinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolates Obtained from Bovine Carcasses in Mexico" by Saul Aguilar-Montes de Oca, Martin Talavera, Edgardo Soriano-Vargas, JEANNETTE BARBA, Jesus Vazquez-Navarrete, and Jorge Acosta-Dibarrat.

The corresponding author is: Martin Talavera.

The manuscript has been assigned Manuscript #: JFP-14-195.

If you are not aware of this submission, or if you should not be listed as a co-author, then please contact the journal office at dloynachan@foodprotection.org

Sincerely,

Didi Loynachan

Administrative Editor

Journal of Food Protection

dloynachan@allentrack.net

Resistance to β -lactams and quinolones in *Escherichia coli* isolates from bovine carcass

Determination of Extended Spectrum β -Lactamases/AmpC β -Lactamases and Plasmid Mediated Quinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolates Obtained from Bovine Carcasses in Mexico

Saúl Aguilar Montes de Oca^{1*}, Martín Talavera-Rojas¹, Edgardo Soriano-Vargas¹, Jeannette Barba², Jesús Vázquez-Navarrete³, Jorge Acosta-Dibarrat¹.

¹Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Carretera Toluca-Atlacomulco, Km 15.5, CP 50200, Toluca, Estado de México.

²Departamento de Salud Pública, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Carretera a Nogales, Km. 15.5, CP 45110, Zapopan, Jalisco, México.

³Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, Agrícolas y Forestales, CENID, Microbiología Animal, Carretera Toluca-México, Km. 15.5, CP 05110. Palo Alto, D.F.

Key words: *Escherichia coli*, antibiotic resistance, β -lactams, quinolones

*Author for correspondence. Martín Talavera Rojas, Tel and Fax: +52(722)2965555, E-mail: talaverarojas@gmail.com

ABSTRACT

Food-borne bacterial infections have worldwide importance and a great variety of antibiotic resistance mechanisms, mainly of the chromosome type, have rapidly developed. Antimicrobial resistance was determined in this study in terms of the presence of extended spectrum β -lactamases (ESBLs), plasmid AmpC β -Lactamases (pAmpC) and plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) from 155 *Escherichia coli* isolates obtained from bovine carcasses from two States in Mexico (State of Mexico and Jalisco). Isolates were challenged with β -lactam antimicrobials (ampicillin, ceftazidime and cefotaxime) and quinolones (nalidixic acid and ciprofloxacin). The presence of the *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA}, *bla*_{CMY}, *bla*_{MOX}, *bla*_{LAT}, *bla*_{BIL}, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr* and *qepA* genes was determined by PCR. Clonal relationship was determined using PFGE. Highest resistance was found to be to nalidixic acid (64%), followed by ampicillin (32%), ciprofloxacin (10%), ceftazidime and cefotaxime (both 1.3%). Genes that were detected were *bla*_{CMY} (n=1), *bla*_{TEM} (n=24), *qnrB* (n=9) and *qnrS* (n=7). PFGE gel analysis showed that the majority of isolates had a different genotypic profile. To our knowledge this is the first report of the presence of the *qnrB*, *qnrS* and *bla*_{CMY} genes in *Escherichia coli* isolated from bovine meat in Mexico.

Escherichia coli causes intestinal and extra-intestinal infections due to it harbors various adherence and virulence factors (6). A large part of these infections are treated with β -lactam and quinolone antimicrobials, which are considered critical in Human Medicine by the World Health Organization. Nevertheless, their widespread use in the health sector, as well as their inadequate use in Veterinary Medicine, have put their usefulness at risk due to the spread of microorganisms that are resistant to these antibiotics (5).

The presence of infections caused by *E. coli* resistant to β -lactam antimicrobials such as extended spectrum cephalosporins and quinolones has reached very high levels (21, 22). The main resistance mechanism to these antimicrobials is generated through β -lactamase enzymes of which the extended spectrum β -lactamases (ESBLs) of the TEM, SHV and CTX-M families, as well as plasmid AmpC β -lactamases are noteworthy. Both types of β -lactamases provide resistance to cephalosporins such as ceftazidime and cefotaxime, albeit they are different in that ESBLs are inactivated by β -lactamase inhibitors such as clavulanate, sulbactam or tazobactam while pAmpC are resistant to these inhibitors (22).

Furthermore, resistance to quinolones has increased during the last two decades in *E. coli* isolates obtained from human patients and hospital facilities, as well as from animal origin isolates. Although the main mechanisms of resistance to quinolones are coded in the chromosome, plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) has been reported since 1998. These include the Qnr proteins, acetyltransferase aminoglycoside enzyme (AAC(6')-Ib-cr) or the QepA efflux pump, which although they provide low-level resistance to quinolones they are a favorable start for the selection of additional resistance mechanisms. The increase in resistance to β -lactam and quinolone antimicrobials is possibly due to their widespread use in Human and Veterinary Medicine (21).

Apart from the acquisition of resistance genes, the interchange of *E. coli* isolates between humans and animals destined for human consumption is very important because they latter can act as reservoirs of isolates resistant to antimicrobials and cause disease in humans (26).

In Mexico the presence of the *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M} ESBLs coding genes has been reported from hospital infections. Furthermore, the *qnr A, B* and *S*, *aac(6')-Ib-cr*, and *qepA* genes

have also been reported. All these genes for antimicrobial resistance have been identified in various genera of the *Enterobacteriaceae* family isolated mainly in hospitals for humans throughout the country (10, 23).

In contrast, little is known in Mexico on the presence of these resistance genes in animal-origin or meat product isolates. Only a single study has demonstrated the presence of plasmid AmpC β -lactamase (pAmpC) *bla*_{CMY-2} in animal origin *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates (29). The objective of this study was to examine the presence of ESBL/pAmpC and PMQR determinants in *E. coli* isolates from bovine meat of two States in Mexico.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolates. A total of 155 *E. coli* isolates were collected from two States in Mexico, 75 isolates were from the State of Mexico (56 isolates from bovine carcasses in municipal slaughterhouses, 12 from food processing plants and 7 from minced meat in butcher's shops), and 80 isolates of bovine carcasses from municipal slaughterhouses in Jalisco.

Isolates were inoculated into MacConkey agar plates, a single colony from each plate was selected, subjected to conventional biochemical tests and confirmed by PCR using primers UAL1939b 5'-ATGGAATTTTCGCCGATTTTGC-3' and UAL2105b 5'-ATTGTTTGCCTCCCTGCTGC-3' to identify the *uidA* gene that codes for the β -glucuronidase enzyme (14).

Antimicrobial susceptibility testing. The test carried out using the disk diffusion method on Mueller-Hinton agar according to the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (3). The following antimicrobials were used: ampicillin 10 μ g (AM); ceftazidime 30 μ g (CAZ); cefotaxime 30 μ g (CTX); nalidixic acid 30 μ g (NA); and ciprofloxacin 5 μ g (CIP). Isolates resistant to β -lactam antimicrobials were subjected to a ESBLs confirmatory test using cefotaxime and ceftazidime on their own and in association with 10 μ g clavulanic acid (CLA), as described by CSLI (4). The ATCC 25922 *E. coli* strain was used as control.

Detection of antimicrobial resistance genes. All isolates were tested using PCR in order to detect the *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA}, *bla*_{CMY}, *bla*_{MOX}, *bla*_{LAT} and *bla*_{BIL} genes using the previously mentioned primers (Table 1) (7). In order to determine the presence of the *qnrA*, *qnrB* and *qnrS* genes a multiplex PCR was used followed by an end-point PCR. The *aac(6')-Ib-cr* and *qepA* genes were analyzed using primers specific to each gene (Table 1) (2, 20, 28).

Pulsed-field gel electrophoresis. The clonal relationship of the strains that were resistant to CAZ, CTX and CIP was carried out using PFGE of samples digested with the XbaI restriction enzyme in agarose following the standardized protocol of the Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA (16). Electrophoresis was carried out using a CHEF-DRII chamber. Band patterns were analyzed using the NTSYSpc version 2.2 software while the relationships among genotypes were determined using the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) and band similitude was calculated using Dice's coefficient.

RESULTS

Of the 155 *Escherichia coli* isolates confirmed by biochemical tests and the presence of the *uidA* gene, 64% (99/155) were resistant, 6% (9/155) intermediately resistant and 30% (47/155) were susceptible to NA. Nevertheless, in the case of CIP, 88% (135/155) of isolates were susceptible, 2% (3/155) intermediately resistant and 10% (16/155) resistant. In terms of AM, 65% (100/155) were susceptible, 3% (5/155) were intermediately resistant and 32% (50/155) were resistant. Only two isolates (1.3%) showed resistance to CAZ and CTX, while the rest 98.7% (153) were susceptible. The confirmatory test for determining ESBLs in these two isolates showed a different pattern to that established by CLSI since they were resistant to CAZ, CTX and their combination with CLA.

The *bla*_{TEM} gene was present in 48% (24/50) of the isolates resistant to AM. Of the two isolates suspected of producing the AmpC β -lactamase, only 1 had the *bla*_{CMY} gene while for the other the gene that provided β -lactam antibiotic resistance could not be determined (Table 2). Up to 5% (5/100) of the isolates phenotypically susceptible to AM had the

*bla*_{TEM} gene, while none of the intermediately resistant isolates had this gene. All isolates that had the *bla*_{TEM} gene were phenotypically susceptible to CAZ and CTX.

In terms of resistance to quinolones, we found that 10% (16/155) of the isolates had some of the *qnr* genes, 9 isolates had the *qnrB* gene and 7 the *qnrS* gene, while no isolate had the *qnrA* gene. Up to 87.5% (14/16) of the isolates that had a *qnr* gene were phenotypically susceptible to CIP and only 12.5% (2/16) of the isolates that also had the *qnrS* gene were resistant to this antimicrobial. Furthermore, only 31% (5/16) of the isolates had both the *qnr* and the *bla*_{TEM} gene. The *aac(6')-Ib-cr* and *qepA* genes were not detected (Table 2).

Isolates showed an almost equal distribution of the *bla*_{TEM} gene among both States, 52% (15/29) of the isolates that carried the gene came from the State of Mexico, while the remaining 48% (14/29) came from Jalisco. Also, 55% (5/9) of isolates carrying the *qnrB* gene were from the State of Mexico, while 44% (4/9) came from Jalisco. In contrast, 86% of the isolates positive to the *qnrS* gene came from the State of Mexico and only 14% (1/7) from Jalisco. The single isolate with the *bla*_{CMY} gene came from the State of Jalisco (Table 3).

PFGE. A total of 18 isolates with intermediate sensitivity and resistant to CIP, CAZ and CTX were selected from the 155 isolates in order to obtain their genetic profiles using the PFGE technique from which a dendrogram was constructed (Figure 1) that shows the phylogenetic relationship among isolates. The presence of 2 distinct clades with a <70% similitude between them can be observed in Figure 1, one composed of a single isolate (isolate 147) from Jalisco and the other encompassing the remaining isolates (17) from the States of Mexico and Jalisco. Within the largest clade two isolates were found to be closely related between them (isolates 4 and 15 from municipal slaughterhouses in the State of Mexico) that were resistant to CIP and had a 100% similitude coefficient, which suggests that they had clonal relationship.

DISCUSSION

Several studies have shown the versatility of application of molecular tests in order to achieve a more sensitive and specific detection of *E. coli* isolates. Nevertheless, various

limiting factors of molecular tests must be taken into account, for example, the presence of the *uidA* gene in some species of the *Shigella* genus, therefore it is important to also carry out biochemical tests in order to have a more trustworthy result (14, 15).

Resistance of up to 64% to NA and 10% to CIP was found in this study, which contrasts with the results obtained in a Polish study by Wasyl *et al* (2013) in which they found resistance of up to 3.0 and 3.3%, respectively, in *E. coli* isolates from cattle sacrificed in slaughterhouses. This study also found resistance to AM of up to 32%, while for CAZ and CTX it reached 1.3%. The aforementioned authors reported a much lower resistance of 8.1% for AM, albeit similar resistance levels for CAZ (1.0%) and CTX (1.3%) (27). Another study in the United States of America, which included *E. coli* isolates obtained from beef reported resistance levels to AM of 6.0%, CIP of 0% and NA of 0.8% (30). A German study found that isolates obtained from bull calves showed up to 59% resistance to AM, 3% to CAZ, 1.4% to CTX, 10.5% to NA and 13.3% to CIP (17). Lastly, a study carried out in France found resistance levels of up to 61% to amoxicillin, 1.0% to CTX, 0% to CAZ, 14.7% to NA and 5.4% to enrofloxacin (12). In general, the results in this study showed resistance levels to antimicrobials that were similar, and sometimes higher for some of them, when compared to those found in the aforementioned countries. Such increase in resistance has also been observed in studies carried out with human-origin *E. coli* isolates in Mexico. Amabile-Cuevas (1) reported resistance levels of up to 74% for AM, 33% for CIP, and 8% for CAZ, which could suggest the spread of clones or antimicrobial resistance mechanisms between the human and animal populations in our country.

To our knowledge this is the first report of *Escherichia coli* isolates collected from bovine meat samples that have the *bla*_{CMY} gene, as well as the first report of the presence of the *qnrB* and *qnrS* genes in animal-origin isolates in Mexico. This finding highlights the possibility that isolates that are carriers of these resistance mechanisms decrease the efficacy of antimicrobials used in humans as they become less effective for fighting infections placing Public Health at risk.

The presence of the *bla*_{CMY} gene agrees with a study carried out in Mexico with *Salmonella* Typhimurium that found that it was the only gene present that provided resistance to cephalosporins, which in turn suggests the wide distribution of the gene within isolates of different origins in our country (29). In North America the presence of the *bla*_{CMY} gen, specifically the *bla*_{CMY-2} variant, is relatively common, although the plasmid AmpC β-lactamase is more widespread as it is found in isolates from samples of poultry, pig and cattle (8, 9, 11, 19).

The *bla*_{TEM} gene was present in almost half of the isolates resistant to AM. Nevertheless, 52% (26/50) of the isolates resistant to AM did not have this gene. This suggests that there is another gene that is responsible for phenotypic resistance, such as the *bla*_{PSE-1} gene, whose presence has been reported in *Salmonella* spp. isolates in Mexico (24).

This study showed a relatively low frequency of bovine-origin isolates that contained the *bla*_{CMY} gene when compared to other animal species (29). This could be because in general, isolates recovered from cattle have the least level of resistance when compared to pigs and poultry which is related to animal production practices of farm animals used for human consumption, as well as to the quantity and class of antimicrobials that are used, which can generate resistance due to the selective pressure to which microorganisms are being subjected to (13). Nevertheless, the fact that an *E. coli* isolate that had the *bla*_{CMY} gene was found suggests that such gene could spread in the following years within animal populations and meat products in a similar fashion as what is observed in isolates from *Salmonella* spp. in Mexico (29).

In regards to the resistance to quinolones, 16 isolates were found that had *qnr* genes. Studies carried out in other countries also using *E. coli* which were obtained from cattle show a lower number of positive isolates. This could reflect that in Mexico there is a wider spread of this gene in bovine-origin isolates. For example, a study carried out by Kirchner *et al* (2011) in the United Kingdom found a single *E. coli* isolate from cattle that had the *qnrS* gene. Furthermore, a study that involved 13 European countries with isolates from different sources also found a single bovine-origin isolate that also had the *qnrS* gene (18, 25).

Notwithstanding, 87.5% (14/16) of the isolates carriers of a *qnr* gene were susceptible to ciprofloxacin confirming that these genes only slightly increase their resistance to such antibiotics, and they are classified as susceptible under the CLSI criteria making them pass unnoticed. Nevertheless, it has been reported that the presence of *qnr* genes favor the acquisition of other mechanisms of resistance to quinolones (21). This characteristic is a risk for creating microorganisms that are resistant to wide spectrum antibiotics which are the pharmaceuticals of choice for treating infectious diseases.

The PFGE analysis showed that the majority of the isolates had differing genotypic profile. Both clades formed did not show particular similitudes which would group isolates by State of origin, with the exception of the two isolates that had similar banding patterns suggesting same clonal origin at the local level. Nevertheless, cross-contamination during processing in abattoir cannot be ruled out. As such, it is necessary to compare the genotypic profiles of these isolates with those obtained from clinical studies in Mexican hospitals in order to determine if there are similarities that could indicate the spread of a clone that is affecting both humans and animals.

This study evidences the fact that the detection of these antimicrobial resistance genes in animal-origin isolates constitutes a warning of the risk and the lack of limiting and control of antimicrobial treatments used in Veterinary Medicine represents, as well as their possible transmission through the food chain, especially in meat products. In Mexico restrictions have been placed upon the sale of antimicrobials. Nevertheless, such measures only apply to pharmaceuticals for human use excluding those used in Veterinary Medicine. As such, their prophylactic application or as growth promoters could contribute to an increase in antimicrobial resistance levels as years go by. Furthermore, it is evident that further epidemiological studies are needed on the presence of β -lactamase and PMQR determinants in animal origin isolates in order to determine if these resistance mechanisms are spreading, as well as allow the establishment of mechanisms that counter antimicrobial resistance.

REFERENCES

1. Amábile-Cuevas C. 2010. Antibiotic resistance in Mexico: a brief overview of the current status and its causes. *J Infect Dev Ctries.* 4(3):126-131.
2. Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordmann P. 2007. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother.*, 60(2):394-397.
3. Clinical and Laboratory Standard Institute. 2012. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*, 19th edition, Approved Standard M02-A11. Wayne, PA.
4. CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) 2012. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 22nd informational supplement. M100-S22. Wayne, PA.
5. Collignon P, Powers JH, Chiller TM, Aidara-Kane A, Aarestrup FM. 2009. World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: A critical step for developing risk management strategies for the use of antimicrobials in food production animals. *Clin Infect Dis.* 49(1):132-141.
6. Croxen MA, Finlay BB. 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.* 8(1):26-38.
7. Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. 2010. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 65(3):490-495.
8. Doi Y, Paterson DL, Egea P, Pascual A, López-Cerero L, Navarro MD, Adams-Haduch JM, Qureshi ZA, Sidjabat HE, Rodríguez-Baño J. 2010. Extended-spectrum and CMY-type β -lactamase-producing *Escherichia coli* in clinical samples and retail meat from Pittsburgh, USA and Seville, Spain. *Clin Microbiol Infect.* 16(1):33-38.
9. Frye JG, Fedorka-Cray PJ, Jackson CR, Rose M. 2008. Analysis of *Salmonella enterica* with reduced susceptibility to the third-generation cephalosporin

- ceftriaxone isolated from U.S. cattle during 2000-2004. *Microb Drug Resist.* 14(4):251-258.
10. Garza-González E, Mendoza Ibarra SI, Llaca-Díaz JM, Gonzalez GM. 2011. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* isolates at a tertiary-care center in Monterrey, Mexico. *J Med Microbiol.* 60(Pt 1):84-90.
 11. Glenn LM, Englen MD, Lindsey RL, Frank JF, Turpin JE, Berrang ME, Meinersmann RJ, Fedorka-Cray PJ, Frye JG. 2012. Analysis of antimicrobial resistance genes detected in multiple-drug-resistant *Escherichia coli* isolates from broiler chicken carcasses. *Microb Drug Resist.* 18(4):453-463.
 12. Haenni M, Châtre P, Métayer V, Bour M, Signol E, Madec JY, Gay E. (2014): Comparative prevalence and characterization of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in dominant versus subdominant enteric flora in veal calves at slaughterhouse, France. *Vet Microbiol.* pii: S0378-1135(14)00113-8. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.02.023.
 13. Harada K, Asai T. 2010. Role of antimicrobial selective pressure and secondary factors on antimicrobial resistance prevalence in *Escherichia coli* from food-producing animals in Japan. *J Biomed Biotechnol.* 2010:180682. doi: 10.1155/2010/180682.
 14. Heijnen L, Medema G. 2006. Quantitative detection of *E. coli*, *E. coli* O157 and other Shiga toxin producing *E. coli* in water samples using a culture method combined with real-time PCR. *J Water Health.* 4: 487–498.
 15. Horakova K, Mlejnkova H, Mlejnek P. J. 2008. Specific detection of *Escherichia coli* isolated from water samples using polymerase chain reaction targeting four genes: cytochrome bd complex, lactose permease, β -D-glucuronidase, and β -D-galactosidase. *Appl Microbiol.* 105(4):970-976.
 16. Hunter SB, Vauterin P, Lambert-Fair MA, Van Duyne MS, Kubota K, Graves L, Wrigley D, Barrett T, Ribot E. 2005. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis

- protocols: converting the national databases to the new size standard. *J. Clin. Microbiol.* 43:1045–1050.
17. Kaesbohrer A, Schroeter A, Tenhagen BA, Alt K, Guerra B, Appel B. 2012. Emerging antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* with public health relevance. *Zoonoses Public Health.* 59 Suppl 2:158-165.
 18. Kirchner M, Wearing H, Teale C. 2011. Plasmid-mediated quinolone resistance gene detected in *Escherichia coli* from cattle. *Vet Microbiol.* 148(2-4):434-435.
 19. Mollenkopf DF, Kleinhenz KE, Funk JA, Gebreyes WA, Wittum TE. 2011. *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* harboring *bla_{CMY}* in retail beef and pork products. *Foodborne Pathog Dis.* 8(2):333-336.
 20. Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. 2006. Prevalence in the United States of *aac(6)-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(11):3953-3955.
 21. Poirel L, Cattoir V, Nordmann P. 2012. Plasmid Mediated Quinolone Resistance; Interactions between Human, Animal, and Environmental Ecologies. *Front Microbiol.* 3:24. doi: 10.3389/fmicb.2012.00024.
 22. Seiffert SN, Hilty M, Perreten V, Endimiani A. 2013. Extended-spectrum cephalosporin-resistant Gram-negative organisms in livestock: an emerging problem for human health?. *Drug Resist Updat.* 16(1-2):22-45.
 23. Silva-Sánchez J, Cruz-Trujillo E, Barrios H, Reyna-Flores F, Sánchez-Pérez A; Bacterial Resistance Consortium, Garza-Ramos U. 2013. Characterization of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes in extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* pediatric clinical isolates in Mexico. *PLoS One.* 8(10):e77968. doi: 10.1371/journal.pone.0077968.
 24. Varela-Guerrero JA, Talavera-Rojas M, Gutiérrez-Castillo Adel C, Reyes-Rodríguez NE, Vázquez-Guadarrama J. 2013. Phenotypic-genotypic resistance in *Salmonella* spp. isolated from cattle carcasses from the north central zone of the State of Mexico. *Trop Anim Health Prod.* 45(4):995-1000.

25. Veldman K, Cavaco LM, Mevius D, Battisti A, Franco A, Botteldoorn N, Bruneau M, Perrin-Guyomard A, Cerny T, De Frutos Escobar C, Guerra B, Schroeter A, Gutierrez M, Hopkins K, Myllyniemi AL, Sunde M, Wasyl D, Aarestrup FM. 2011. International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. *J Antimicrob Chemother.* 66(6):1278-1286.
26. Vincent C, Boerlin P, Daignault D, Dozois CM, Dutil L, Galanakis C, Reid-Smith RJ, Tellier PP, Tellis PA, Ziebell K, Manges AR. (2010): Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Emerg Infect Dis.* 16(1):88-95.
27. Wasyl D, Hoszowski A, Zając M, Szulowski K. 2013. Antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* isolated from animals at slaughter. *Front Microbiol.* 4:221. doi: 10.3389/fmicb.2013.00221.
28. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Konda T, Arakawa Y. 2007. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 51(9):3354-3360.
29. Zaidi MB, Leon V, Canche C, Perez C, Zhao S, Hubert SK, Abbott J, Blickenstaff K, McDermott PF. 2007. Rapid and widespread dissemination of multidrug-resistant *bla*_{CMY-2} *Salmonella* Typhimurium in Mexico. *J Antimicrob Chemother.* 60(2):398-401.
30. Zhao S, Blickenstaff K, Bodeis-Jones S, Gaines SA, Tong E, McDermott PF. 2012. Comparison of the prevalences and antimicrobial resistances of *Escherichia coli* isolates from different retail meats in the United States, 2002 to 2008. *Appl Environ Microbiol.* 78(6):1701-1707.

Table 1. Primers used for detecting the β -lactam and quinolone resistance genes

Primer	Sequence (5'→3')	Gene	Amplicon size (bp)
MultiTSO-T_for	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	<i>bla</i> _{TEM}	800
MultiTSO-T_rev	CGTTCATCCATAGTTGCCTGA C		
MultiTSO-S_for	AGCCGCTTGAGCAAATTA AAC	<i>bla</i> _{SHV}	713
MultiTSO-S_rev	ATCCCGCAGATAAATCACCAC		
MultiTSO-O_for	GGCACCAGATTCAACTTTCAA G	<i>bla</i> _{OXA}	564
MultiTSO-O_rev	GACCCCAAGTTTCCTGTAAGT G		
MultiCTXMGp1_for	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA ^b	<i>bla</i> _{CTX-M} Grupo 1	688
MultiCTXMGp1- 2_rev	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT ^b		
MultiCTXMGp2_for	CGTTAACGGCACGATGAC	<i>bla</i> _{CTX-M} Grupo 2	404
MultiCTXMGp1- 2_rev	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT ^b		
MultiCTXMGp9_for	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	<i>bla</i> _{CTX-M} Grupo 9	561
MultiCTXMGp9_rev	TGATTCTCGCCGCTGAAG		
MultiCaseMOX_for	GCAACAACGACAATCCATCCT	<i>bla</i> _{MOX} , <i>bla</i> _{CMY}	895
MultiCaseMOX_rev	GGGATAGGCGTAACTCTCCCA A		
MultiCaseCIT_for	CGAAGAGGCAATGACCAGAC	<i>bla</i> _{LAT} , <i>bla</i> _{BIL} <i>bla</i> _{CMY}	538
MultiCaseCIT_rev	ACGGACAGGGTTAGGATAGY ^b		
QnrAm-F	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	<i>qnrA</i>	580
QnrAm-R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC		
QnrBm-F	GGMATHGAAATTCGCCACTG ^b	<i>qnrB</i>	264
QnrBm-R	TTTGCYGYCGCCAGTCGAA ^b		
QnrSm-F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	<i>qnrS</i>	428
QnrSm-R	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG		

AAC(6')-Ib-cr	TTGCGATGCTCTATGAGTGGC		
	TA	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	482
AAC(6')-Ib-cr	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT		
QEPA-F	GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG		
QEPA-R	CTTCCTGCCCGAGTATCGTG	<i>QepA</i>	199

^bY=T or C; R=A or G; S=G or C; D=A or G or T; H=A or C or T.

Table 2. Characterization of the antimicrobial resistance genes and their phenotypic sensitivity pattern

Resistance pattern ^a	Num. Of isolates	β -lactamase/ <i>qnr</i> (Num. of carrier isolates)
AM, CAZ, CTX, NA, CIP ^b	1	<i>bla</i> _{CMY} (1)
AM, NA, CIP	7	<i>bla</i> _{TEM} (7)
AM, NA, CIP ^b	3	<i>bla</i> _{TEM} (3)
AM, NA	9	<i>bla</i> _{TEM} (5), <i>qnrB</i> (3), <i>qnrS</i> (1) ^c
AM	7	<i>bla</i> _{TEM} (7), <i>qnrB</i> (1), <i>qnrS</i> (1) ^c
AM, NA ^d	2	<i>bla</i> _{TEM} (2), <i>qnrB</i> (1) ^e
----	2	<i>qnrB</i> (1), <i>qnrS</i> (2) ^f
NA, CIP	2	<i>bla</i> _{TEM} (2) ^g , <i>qnrS</i> (2)
NA	2	<i>bla</i> _{TEM} (2) ^g , <i>qnrS</i> (1) ^h
NA ^d	3	<i>qnrB</i> (3)
NA, CIP ^b	3	<i>bla</i> _{TEM} (1) ^g

^a AM, ampicillin; CAZ, ceftazidime; CTX, cefotaxime; NA, nalidixic acid; CIP, ciprofloxacin.

^b Intermediate susceptibility to CIP.

^c A single isolate had the *bla*_{TEM} + *qnrB* + *qnrS* genes.

^d Intermediate susceptibility to NA.

^e A single isolate has the *bla*_{TEM} + *qnrB* genes.

^f A single isolate has the *qnrB* + *qnrS* genes.

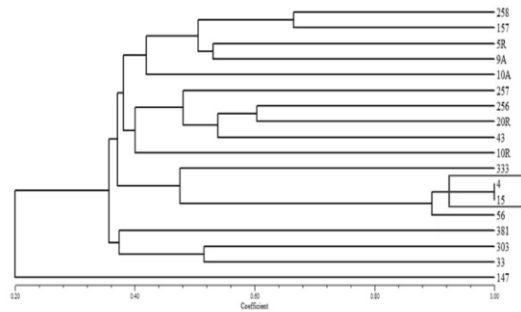
^g A single isolate has the *bla*_{TEM} + *qnrS* genes.

^h Isolates that have the *bla*_{TEM} gen but are sensitive to AM.

Table 3. Distribution of resistance genes from different origin sites

Number of isolates n=155	Resistance genes				
	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{CMY}	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>bla</i> _{TEM} / <i>qnr</i>
State of Mexico (75)					
Municipal slaughterhouses (56)	9				
TIF type slaughterhouses (12)	2		3	1	
Butcher's shops (7) Jalisco (80)	4		2	5	4
Municipal slaughterhouses (80)	14	1	4	1	1
Total	29	1	9	7	5

Figure 1. Dendrogram constructed from PFGE showing the genotypic relationship between *E. coli* isolates.



IDENTIFICACIÓN:

Un total de 155 aislamientos provenientes de diferentes ceparios (75 aislamientos recolectados en el Estado de México y 80 aislamientos originarios de Jalisco) fueron identificados como *Escherichia coli* fenotípica y genotípicamente.

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA:

En el caso de las quinolonas, se observó que de los 155 aislamientos de *Escherichia coli*, 64% (99/155) fueron resistentes al NA, mientras que 30% (47/155) fueron sensibles, en contraste, para el CIP un 88% (136/155) fueron sensibles y solamente un 10% (16/155) y 2% (3/155) fueron resistentes e intermedios a este antibiótico respectivamente (Figura 11).

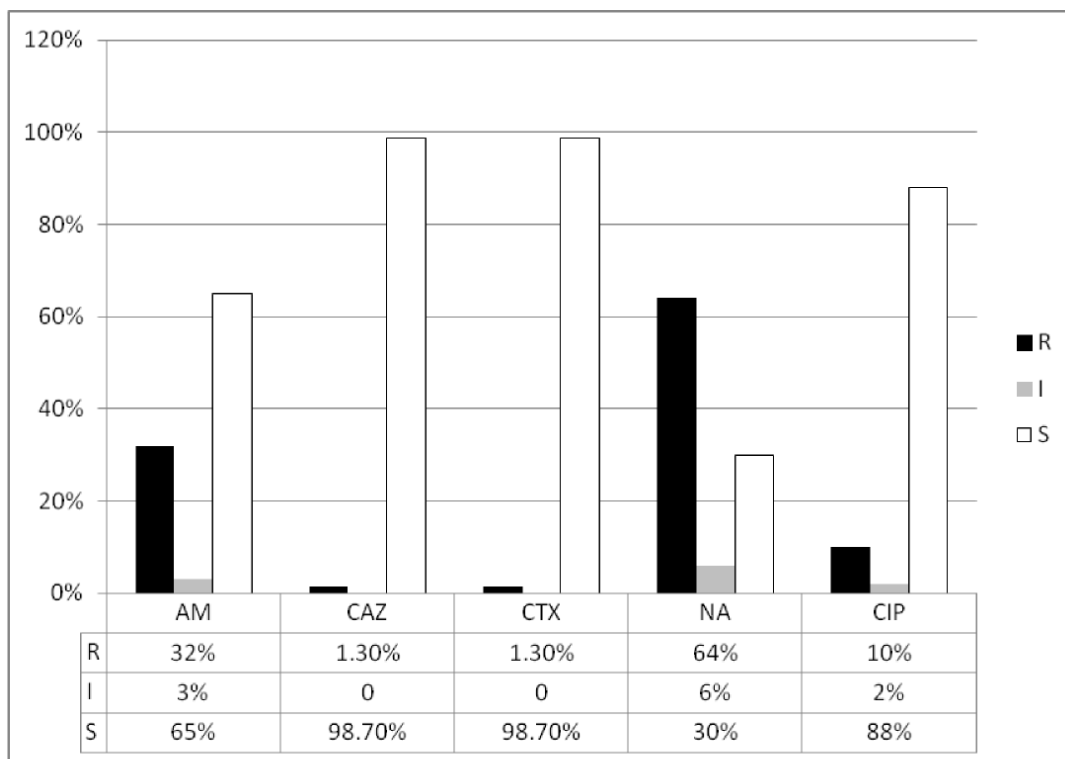
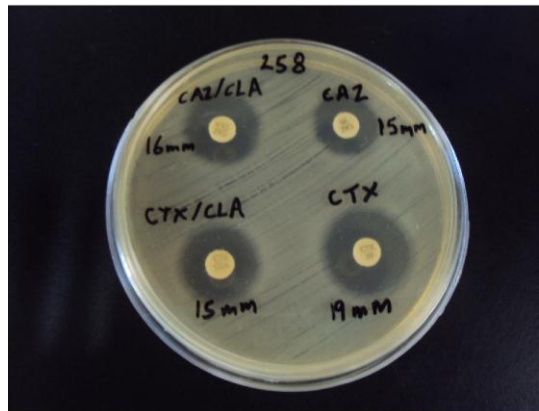


Figura 11. Sensibilidad antimicrobiana de aislamientos de *E. coli* (n=155), NA:ácido nalidíxico, CIP: ciprofloxacino, AM: ampicilina, CAZ: ceftazidima, CTX: cefotaxima (Datos originales)

En el caso de los antibióticos β -lactámicos, se encontró que la AM tuvo el mayor índice de resistencia con un 32% (50/155), mientras que en el caso de la CAZ y CTX solo dos aislamientos (1.3%) mostraron resistencia a la CAZ y CTX, mientras que el restante 98.7% (153) fueron susceptibles (Figura 11). Los dos aislamientos resistentes a CAZ y CTX fueron sometidos a la prueba confirmatoria para determinar ESBLs, los halos de inhibición obtenidos mostraron un patrón diferente a lo establecido por el CLSI al ser resistentes a CAZ, CTX y a su combinación con el CLA (Figura 12).

Figura 12. Halos de inhibición obtenidos con la prueba confirmatoria para ESBLs



(Fuente: Datos originales)

DETECCIÓN DE GENES QUE CODIFICAN ESBLs Y GENES *QNR*:

El gen *bla*_{TEM} estuvo presente en 48% (24/50) de los aislamientos resistentes a la AM. De los dos aislamientos sospechosos de ser productores de β -lactamasas AmpC, sólo 1 tuvo el gen *bla*_{CMY}, mientras que en el otro aislamiento no se pudo determinar el gen que le otorga la resistencia a los antibióticos β -lactámicos. Cinco por ciento (5/100) de los aislamientos susceptibles fenotípicamente a la AM presentaron el gen *bla*_{TEM}, mientras que ninguno de los aislamientos intermedios presento este gen. Todos los aislamientos portadores del gen *bla*_{TEM}, fueron susceptibles fenotípicamente a la CAZ y CTX (Cuadro 10)(Figura 13).

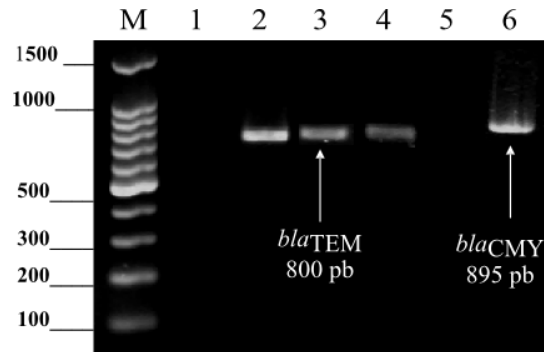


Figura 13. Detección de genes *bla*_{TEM} y *bla*_{CMY}.
 Gel de agarosa (2%); M, marcador de peso molecular
 (Benchtop 100 pb ladder; Promega, Madison WI, USA);
 Carril 1, *E. coli* ATCC 25922; Carril 2, 3 y 4, *E. coli* (*bla*_{TEM}⁺);
 Carril 5, *E. coli* (*bla*_{TEM}⁻); Carril 6, *E. coli* (*bla*_{CMY}⁺)
 (Fuente: Datos originales)

En el caso de la resistencia a quinolonas, se encontró que el 10% (16/155) de los aislamientos presentaron algunos de los genes *qnr*, 9 aislamientos tuvieron el gen *qnrB* y 7 el gen *qnrS*, ningún aislamiento presentó el gen *qnrA*. El 87.5% (14/16) de los aislamientos que presentaron un gen *qnr* fueron susceptibles fenotípicamente al CIP y solamente el 12.5% (2/16) de los aislamientos que además portaban el gen *qnrS* fueron resistentes a este antimicrobiano. De igual manera, solamente el 31% (5/16) de los aislamientos presentaron tanto el gen *qnr* y el gen *bla*_{TEM}. No se detectaron los genes *aac(6')-Ib-cr* y *qepA* (Cuadro 10) (Figura 14).

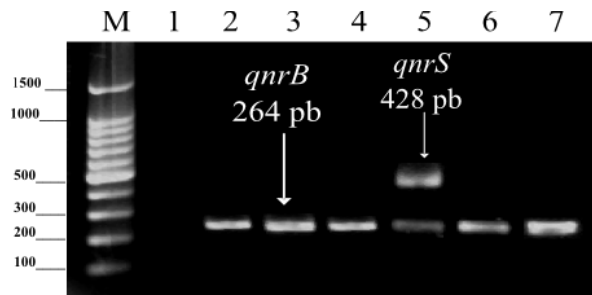


Figura 14. Detección de genes *qnr*. Gel de agarosa (2%);
 M, marcador de peso molecular (Benchtop 100 pb ladder;
 Promega, Madison WI, USA); Carril 1, *E. coli* ATCC
 25922; Carril 2 a 4, *E. coli* (*qnrB*⁺); Carril 5, *E. coli*
 (*qnrB*⁺ y *qnrS*⁺)
 (Fuente: Datos originales)

Cuadro 10. Caracterización de los genes de resistencia antimicrobiana y su patrón de sensibilidad fenotípico

Patron de Resistencia ^a	No. de aislamientos	β -lactamasa/ <i>qnr</i> (No. de aislamientos portadores)
AM, CAZ, CTX, NA, CIP ^b	1	<i>bla</i> _{CMY} (1)
AM, NA, CIP	7	<i>bla</i> _{TEM} (7)
AM, NA, CIP ^b	3	<i>bla</i> _{TEM} (3)
AM, NA	9	<i>bla</i> _{TEM} (5), <i>qnrB</i> (3), <i>qnrS</i> (1) ^c
AM	7	<i>bla</i> _{TEM} (7), <i>qnrB</i> (1), <i>qnrS</i> (1) ^c
AM, NA ^d	2	<i>bla</i> _{TEM} (2), <i>qnrB</i> (1) ^e
----	2	<i>qnrB</i> (1), <i>qnrS</i> (2) ^f
NA, CIP	2	<i>bla</i> _{TEM} (2)*, <i>qnrS</i> (2)
NA	2	<i>bla</i> _{TEM} (2)*, <i>qnrS</i> (1) ^g
NA ^d	3	<i>qnrB</i> (3)
NA, CIP ^b	3	<i>bla</i> _{TEM} (1)*

^a AM, ampicilina; CAZ, ceftazidima; CTX, cefotaxima; NA, ácido nalidíxico; CIP, ciprofloxacino.

^b Susceptibilidad intermedia a CIP.

^c Un aislamiento presenta los genes *bla*_{TEM} + *qnrB* + *qnrS*.

^d Susceptibilidad intermedia a NA.

^e Un aislamiento presenta los genes *bla*_{TEM} + *qnrB*.

^f Un aislamiento presenta los genes *qnrB* + *qnrS*.

^g Un aislamiento presenta los genes *bla*_{TEM} + *qnrS*.

* Aislamientos que presentan el gen *bla*_{TEM} pero son sensibles a la AM.

(Fuente: Datos originales)

En cuanto a la distribución geográfica de los aislamientos, estos mostraron una distribución casi similar del gen *bla*_{TEM} entre las dos entidades federativas, el 52% (15/29) de los aislamientos portadores del gen provenían del Estado de México y el restante 48% (14/29)

eran de Jalisco, para el gen *qnrB*, el Estado de México tuvo el 55% (5/9) de aislamientos portadores y Jalisco el 44% (4/9), mientras que el gen *qnrS* tuvo 86% (6/7) de aislamientos positivos que provenían de carnicerías del Estado de México y Jalisco tuvo solo el 14% (1/7). En el caso del único gen *bla_{CMY}* que se encontró, este pertenece a un aislamiento de Jalisco (Cuadro 11).

Cuadro 11. Distribución geográfica de los genes de resistencia provenientes del Estado de México y Jalisco

Numero de aislamientos n=155	Genes de resistencia				
	<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{CMY}</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>bla_{TEM}/qnr</i>
Estado de México (75)					
Rastros Municipales (56)	9				
Rastro TIF (12)	2		3	1	
Carnicerías (7)	4		2	5	4
Jalisco (80)					
Rastros municipales (80)	14	1	4	1	1
Total	29	1	9	7	5

(Fuente: Datos originales)

PFGE. De los 155 aislamientos se seleccionaron 18 con sensibilidad intermedia y resistente al CIP, CAZ y CTX para obtener sus perfiles genéticos mediante la técnica de PFGE, se fotodocumentaron tres geles diferentes (Figura 15), a partir de los cuales se realizó el análisis en el software NTSYSpc versión 2.2 y se obtuvo un dendograma (Figura 16) que muestra la relación filogenética que guardan los aislamientos. En la figura se observa la presencia de 2 clados que presentan un coeficiente de similitud <70%, uno compuesto por un solo aislamiento (aislamiento 147) proveniente de Jalisco y el otro agrupando el resto de aislamientos (17) provenientes del Estado de México y Jalisco.

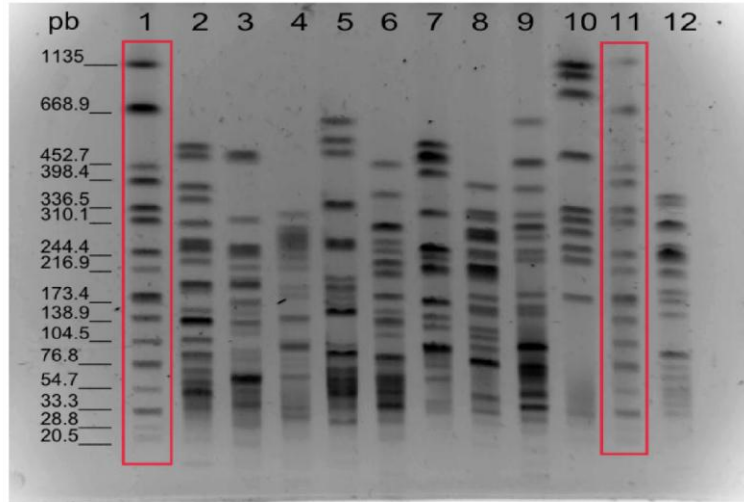
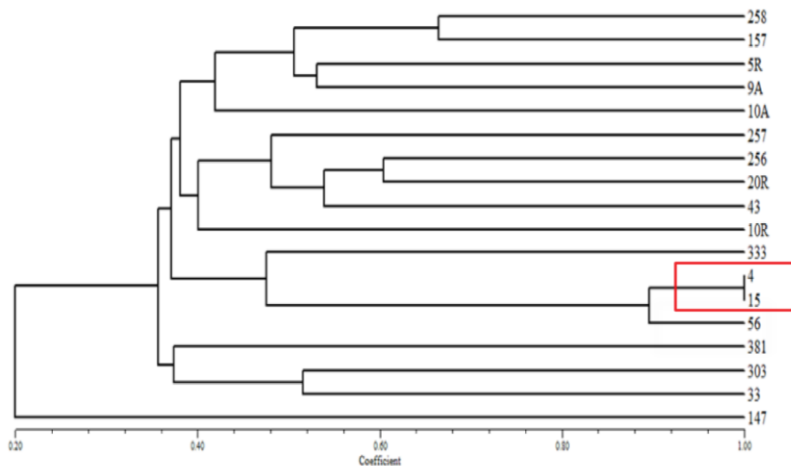


Figura 15. Imagen de un gel de PFGE. La secuencia de números en la parte superior indica el carril correspondiente a cada uno de los aislamientos analizados y se observa el patrón genotípico generado por la enzima de restricción XbaI. Los carriles encerrados en el marco rojo corresponden a la cepa control *Salmonella Braenderup H8912*. En el margen izquierdo se observa el peso molecular de las bandas generadas por esta cepa (Fuente: Datos originales)

Dentro del clado más numeroso se encontró la existencia de 2 aislamientos estrechamente relacionados (aislamientos 4 y 15 provenientes de rastros municipales del Estado de México) resistentes al CIP y que mostraron un coeficiente de similitud del 100%, sugiriendo su posible relación clonal.

Figura 16. Dendrograma generado a partir de los geles de PFGE mostrando la relación genotípica de aislamientos de *E. coli*



(Fuente: Datos originales)

VIII. DISCUSIÓN

En el presente estudio se realizó la identificación de *E. coli* mediante pruebas bioquímicas convencionales y una prueba de PCR. Varios trabajos establecen las ventajas de las pruebas moleculares como lograr una detección e identificación más sensible y específica a nivel de especie (Heijnen y Medema, 2006; Horakova *et al.*, 2008). Otra ventaja es que permite identificar a microorganismos que carecen de actividad β -D-glucoronidasa pero presentan el gen codificante de esta enzima, como es el caso de *E. coli* O157:H7 y que podría no ser detectado mediante pruebas bioquímicas convencionales; en el presente estudio se incluyeron aislamientos de este serotipo previamente descritos (Reyes-Rodríguez *et al.*, 2013), los cuales fueron identificados como *E. coli* mediante la prueba de PCR, lo que demuestra la utilidad de esta prueba para detectar aislamientos que carecen de actividad β -D-glucoronidasa. Sin embargo, aun a pesar de las grandes ventajas que representa esta prueba molecular, se tiene que tener en cuenta las limitaciones que existen, una de las más importantes es que el gen *uidA* también está presente en otros microorganismos, como por ejemplo del género *Shigella*, lo cual podría generar un reporte falso positivo (Horakova *et al.*, 2008). Por lo anterior se decidió emplear las dos pruebas (bioquímica y molecular) para conseguir una identificación más precisa de nuestros aislamientos de estudio.

En el presente trabajo se encontró una resistencia de 64% al NA y 10% al CIP, mientras que un estudio realizado en Polonia por Wasyl *et al.*, 2013 encontraron en aislamientos de *E. coli* provenientes de bovinos sacrificados en rastros, un porcentaje de resistencia a los mismos antimicrobianos de 3.0 y 3.3%, respectivamente. En nuestro estudio la resistencia encontrada para la AM fue de 32%, mientras que para CAZ y CTX fue de 1.3%. Wasyl *et al.*, 2013 también reportan una resistencia de 8.1% para AM y una resistencia similar para CAZ (1.0%) y CTX (1.3%).

En un estudio sobre resistencia antimicrobiana realizado en Estados Unidos que abarco de 2002 a 2008, y en el que se incluyeron aislamientos de *E. coli* obtenidos en carne de

bovino, la frecuencia de resistencia para AM fue de 6.0%, 0% para CIP y 0.8% para NA (Zhao *et al.*, 2012), mientras que para la ceftriaxona el porcentaje fue de 1.2% y de 0.7% para el ceftiofur. Se observa que los niveles de resistencia son mucho menores a los encontrados en nuestro trabajo en México, a excepción de la ceftriaxona (1.2%) que tiene un porcentaje similar a lo que encontramos en nuestro estudio (1.3%).

Otro estudio realizado por Kojima *et al.* (2009) en Japón con aislamientos de *E. coli* reveló una resistencia al NA de 0.8%, al enrofloxacino (fluoroquinolona) de 0.3%; a la AM de 11.7% y al ceftiofur (cefalosporina) un 0%; al comparar estos niveles de resistencia antimicrobiana (aunque algunos no sean los mismos antimicrobianos, son relativamente similares). Al comparar estos resultados con lo obtenido en la presente tesis se observa que en este estudio hay mayor resistencia para las quinolonas y la AM en comparación con los obtenidos en Japón. Cabe destacar que el estudio realizado en ese país asiático se realizó del año 2000 al 2003, por lo que los niveles de resistencia antimicrobiana pudieran haber variado con respecto al año actual.

En Alemania se realizó un estudio con aislamientos de *E. coli* de diferentes especies, incluyendo ganado bovino, en el cual se observaron diferentes grados de resistencia antimicrobiana dependiendo del estado de maduración del ganado y función zootécnica (vacas lecheras, terneras o terneros de carne). Los resultados mostraron que los aislamientos de animales jóvenes (terneros) presentaron un mayor índice de resistencia a diferentes antimicrobianos, con un 59% para AM, 1.4% y 3% para CTX y CAZ, respectivamente; mientras que para las quinolonas se observó una resistencia de 10.5 y 13.3% para el NA y CIP, respectivamente (Kaesbohrer *et al.*, 2012).

Finalmente un estudio realizado en Francia con aislamientos de *E. coli* obtenidos en plantas de faenado encontró una resistencia de 61% para amoxicilina, 1.0% para CTX, 0% para CAZ, 14.7% para NA y 5.4% para enrofloxacino. Se observa que los porcentajes de resistencia son menores a los obtenidos en este estudio, a excepción de la amoxicilina, la

cual sería un antimicrobiano semejante a la AM y en donde el porcentaje es casi el doble de lo informado en nuestro trabajo (32%) (Haenni *et al.*, 2014).

En general, los resultados del presente trabajo demuestran niveles de resistencia similares e incluso más elevados para algunos de los antimicrobianos comparados con los países mencionados, a excepción de algunos casos como la resistencia a la AM en los estudios realizados en Alemania y Francia donde se observa un mayor porcentaje para estos países. Un artículo de revisión realizado por Amabile-Cuevas (2010), muestra que los aislamientos de *E. coli* de origen humano en México presentan una resistencia de 74% para la AM, 33% para CIP y 8% para CAZ, todos estos porcentajes son mayores a los obtenidos en el presente trabajo, sugiriendo que los aislamientos de origen humano presentan un mayor índice de resistencia con respecto a los aislamientos presentes en canales de bovino, sin embargo, falta más información con respecto a otras especies como cerdos y aves para comparar los niveles de resistencia; además es necesario analizar la posible diseminación clonal o intercambio de determinados mecanismos de resistencia antimicrobiana de aislamientos de *E. coli* entre la población humana y animal de nuestro país.

Actualmente existen varios programas encaminados a monitorear de manera constante la resistencia antimicrobiana de microorganismos comensales y zoonóticos aislados en animales destinados a consumo humano o en animales de compañía y cuyos resultados son publicados periódicamente en diferentes revistas científicas, ejemplo de estos programas es el Programa de Vigilancia de Susceptibilidad Antimicrobiana Europea en Animales (EASSA, por sus siglas en inglés) que incluye varios países como Francia, Alemania, España, Reino Unido y otros más, el Sistema de Monitoreo de Resistencia Antimicrobiana Veterinaria Japonesa (JVARM, por sus siglas en inglés) o el Sistema de Monitoreo de Resistencia Antimicrobiana Nacional (NARMS, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos (de Jong *et al.*, 2013; Frye y Jackson, 2013; Kojima *et al.*, 2009). En México se ha realizado un monitoreo de la resistencia antimicrobiana presente en diferentes hospitales, participando en redes internacionales de vigilancia como SENTRY (Gales *et al.*, 2012), sin

embargo, no existe un programa nacional de monitoreo de resistencia antimicrobiana homólogo en animales, por lo tanto, no hay un indicador confiable y constante que pudiera ayudar a determinar los niveles de resistencia en microorganismos presentes en animales destinados al consumo humano, las diferencias de estos niveles de resistencia dependiendo del microorganismo estudiado (*E. coli*, *Salmonella* spp, etc.) o a la especie animal de la cual se aislaron los microorganismos, e incluso comparar la resistencia antimicrobiana con la de la población humana. Dicha información es importante ya que nos permitiría determinar si la resistencia antimicrobiana se incrementa o disminuye a lo largo de los años, en que especie y lugar geográfico es más frecuente este fenómeno y también puede orientarnos para implementar determinadas medidas encaminadas a detener o disminuir la resistencia antimicrobiana.

Este es el primer estudio en México sobre la presencia de aislamientos de *E. coli* recolectados en muestras de carne de bovino que presentan el gen *bla_{CMY}*, así como el primero en informar la presencia de los genes *qnrB* y *qnrS* en canales de bovino de México. El hecho de que sólo se haya identificado el gen *bla_{CMY}* en los aislamientos estudiados, concuerda con un estudio realizado en México con aislamientos de *Salmonella* Typhimurium obtenidos de pacientes humanos y animales destinados a consumo humano en Yucatán, en los que se detectó que este es el único gen presente que confería resistencia a cefalosporinas y que por lo tanto indica su amplia diseminación en aislamientos de diferente origen en nuestro país (Zaidi *et al.*, 2007), no obstante, el hecho de que se haya encontrado un aislamiento resistente a CAZ y CTX, pero para el cual no pudo ser encontrado el gen que le otorga resistencia a los antibióticos β -lactámicos, sugiere que podría haber otro gen que aun no ha sido descrito y que este circulando en las poblaciones bacterianas, se necesita identificar el gen o mecanismo causante de esta resistencia.

En Norteamérica la presencia del gen *bla_{CMY}*, específicamente la variante *bla_{CMY-2}* es relativamente común, siendo la β -lactamasa AmpC plasmídica más diseminada, encontrándose en aislamientos recolectados de muestras de carne de pollo, cerdo y bovino.

En Estados Unidos un estudio realizado recientemente con muestras de diferentes especies para consumo humano mostró que todos los aislamientos resistentes a la cefalosporina ceftiofur portaban el gen *bla*_{CMY-2} y solamente 20% de esos aislamientos resistentes también portaban el gen *bla*_{TEM}, sin encontrar la presencia de los genes de las familias *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} o *bla*_{OXA}, lo que sugiere que estos genes no tienen una gran relevancia para aportar resistencia los antimicrobianos β-lactámicos (Zhao *et al.*, 2012).

En cuanto a la resistencia a la AM, se encontró que gen *bla*_{TEM}, estuvo presente en casi la mitad de los aislamientos resistentes a este antibiótico (24/50), sin embargo, un 52% (26/50) de los aislamientos resistentes a este antibiótico no presentaron este gen; lo que sugiere que otro gen es el responsable de la resistencia fenotípica, como el gen *bla*_{PSE-1}, cuya presencia ha sido reportada en aislamientos de *Salmonella* spp. y *E. coli* en México y Estados Unidos (Frye y Jackson, 2013; Varela-Guerrero *et al.*, 2013).

Nuestro estudio mostró una frecuencia relativamente menor de aislamientos de origen bovino positivos al gen *bla*_{CMY} en comparación con otras especies animales según lo reportado por la literatura, esto puede deberse a que en general, los aislamientos recolectados de bovinos tienen el menor nivel de resistencia en comparación con los provenientes de cerdos y pollos, lo cual se ha relacionado con las practicas de producción de animales destinados al consumo humano y a la cantidad y clase de antimicrobianos usados, y los cuales pueden generar cambios por una presión selectiva a cual están expuestos los microorganismos (Harada y Asai, 2010).

En el caso de la resistencia a quinolonas, se encontraron 16 aislamientos que presentaron los genes *qnr*, estudios realizados en otros países con aislamientos de *E. coli* obtenidos de bovinos muestran un menor número de aislamientos positivos, lo cual pudiera reflejar en México una mayor diseminación de este gen en aislamientos de origen bovino. Existen pocos artículos científicos en los cuales se hayan encontrado aislamientos de *E. coli* de origen bovino portando mecanismos PMQR, por ejemplo, un estudio realizado por

Kirchner *et al.* (2011) en Reino Unido encontraron sólo un aislamiento de *E. coli* obtenido de bovino portando el gen *qnrS*, de igual manera, un estudio que involucró a 13 países europeos con aislamientos de diferentes orígenes encontró sólo un aislamiento de origen bovino portando también el gen *qnrS* (Veldman *et al.*, 2011).

En este trabajo se encontró que el 87.5% (14/16) de los aislamientos portadores de un gen *qnr* fueron susceptibles al ciprofloxacino, lo que confirma el hecho de que estos genes solo incrementan ligeramente la resistencia y ocasionan que sean clasificados como susceptibles bajo los criterios del CLSI y puedan pasar inadvertidos. Sin embargo, se ha reportado que la presencia de los genes *qnr* favorece la adquisición de otros mecanismos de resistencia a quinolonas (Poirel *et al.*, 2012), siendo esta característica un riesgo al generar microorganismos resistentes a antibióticos de amplio espectro los cuales son la primera elección para tratar enfermedades infecciosas.

En nuestro estudio sólo se encontraron genes *qnr*, lo que sugiere que los otros mecanismos de resistencia a quinolonas no están diseminados o son menos frecuentes en los bovinos, en contraste, los 3 genes PMQR incluidos en este estudio han sido descritos en microorganismos aislados en hospitales de nuestro país, señalando su mayor frecuencia en aislamientos de origen humano que de animales.

El análisis de PFGE muestra que la mayoría de los aislamientos tienen un perfil genotípico diferente, también los dos clados observados no mostraron similitudes particulares que agruparan a los aislamientos según la entidad federativa de la que proceden, a excepción de los dos aislamientos que presentaron similitudes en su patrón de bandas, lo que sugiere la presencia de clonalidad a nivel local, sin embargo no se puede descartar que se trate también de una contaminación durante el faenado. Por lo tanto, es necesario comparar los perfiles genotípicos de estos aislamientos con los obtenidos en estudios clínicos en hospitales de México para poder determinar si existen similitudes que pudieran indicar la diseminación de algún clon que esté afectando tanto a humanos como animales.

Se necesitan realizar más estudios de epidemiología molecular encaminados a analizar la relación entre aislamientos resistentes de origen animal y los de la población humana en México. La mayoría de artículos realizados con aislamientos recolectados en hospitales muestran los perfiles de PFGE, sin embargo, la información es más escasa en cuanto al estudio de los perfiles genéticos de aislamientos de origen animal. Zaidi *et al.*, 2007 han encontrado patrones de bandas similares entre aislamientos de origen humano y aislamientos obtenidos en carne de porcinos, lo que podría sugerir la diseminación de algún clon en la región geográfica donde se realizó el estudio, sin embargo, se desconoce si existen similitudes con aislamientos de diferentes especies.

Este estudio pone en evidencia que la detección de estos genes de resistencia antimicrobiana en aislamientos de origen animal, constituye una advertencia del riesgo que representa el no limitar y controlar los tratamientos antimicrobianos empleados en la Medicina Veterinaria, además de su posible transmisión en la cadena alimenticia, específicamente en productos cárnicos. En México se ha impuesto una restricción a la venta de antimicrobianos, sin embargo, esta medida sólo aplica para medicamentos de uso humano, excluyendo a los utilizados en el sector veterinario, por lo que su aplicación profiláctica o como promotores de crecimiento puede contribuir a incrementar los niveles de resistencia antimicrobiana a través de los años. Así mismo, es evidente que se requieren más estudios epidemiológicos sobre la presencia de β -lactamasas y las determinantes PMQR en aislamientos de origen animal para poder determinar si estos mecanismos de resistencia están diseminándose y por ende poder establecer algunos mecanismos encaminados a contrarrestar el fenómeno de la resistencia antimicrobiana.

IX. CONCLUSIONES

Los 155 aislamientos fueron identificados como *E. coli* empleando tanto las pruebas bioquímicas como la prueba de PCR.

Se encontró una resistencia antimicrobiana de 65% para el NA, 32% para la AM, 10% para el CIP y solamente 1.3% para CAZ y CTX.

De los 2 aislamientos resistentes a CAZ y CTX, sólo 1 presentó el gen *bla_{CMY}*, mientras que para el otro aislamiento no se pudo determinar el gen o el mecanismo que le otorga resistencia a estos antimicrobianos.

El gen *bla_{TEM}* estuvo presente en 48% (24/50) de los aislamientos resistentes a la AM, mientras que para los aislamientos restantes no se pudo determinar que genes les otorgan resistencia a este antimicrobiano.

Los genes *qnrB* y *qnrS* estuvieron en 6% (9/155) y 4% (7/155) de los aislamientos respectivamente.

No se encontraron los genes *qnrA*, *aac(6')-Ib-cr* y *qepA*.

La mayoría de los aislamientos presentan un perfil genotípico diferente y tienen una mayor distancia filogenética entre ellos, a excepción de 2 aislamientos que presentaron un perfil idéntico, lo cual sugiere su posible relación clonal.

X. SUGERENCIAS

1. Realizar muestreos sobre los principales patógenos como *E. coli* y *Salmonella* spp. aisladas de las principales especies animales destinadas a consumo humano (bovinos, cerdos y aves) e incluso animales de compañía, para determinar su sensibilidad *in vitro* y comparar los niveles de resistencia entre especies.
2. Detectar y caracterizar elementos genéticos móviles como plásmidos, integrones o secuencias de inserción que estén implicados en la transmisión de estos y otros mecanismos de resistencia.
3. Buscar otros genes de resistencia a antibióticos β -lactámicos que son menos frecuentes como los que codifican las metalo- β -lactamasas o carbapenemasas.
4. Realizar estudios de epidemiología molecular empleando técnicas como la PFGE u otras para estudiar si existen similitudes entre los perfiles genéticos de aislamientos de origen animal y humano.
5. Emplear los aislamientos ya caracterizados como elementos para el desarrollo de mecanismos encaminados a reducir o eliminar la resistencia antimicrobiana.

XI. LITERATURA REVISADA

1. Ahmed AM, Ishida Y, Shimamoto T. (2009): Molecular characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from animals in Japan. *J Appl Microbiol.* 106(2):402-09.
2. Ahmed AM, Motoi Y, Sato M, Maruyama A, Watanabe H, Fukumoto Y, Shimamoto T. (2007): Zoo animals as reservoirs of gram-negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes. *Appl Environ Microbiol.* 73(20):6686-90.
3. Ahmed AM, Shimamoto T. (2011): Molecular characterization of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis in Egypt. *Microbiol Immunol.* 55(5):318-27.
4. Alcantar-Curiel D, Tinoco JC, Gayosso C, Carlos A, Daza C, Perez-Prado MC, Salcido L, Santos JI, Alpuche-Aranda CM. (2004): Nosocomial bacteremia and urinary tract infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* with plasmids carrying both SHV-5 and TLA-1 genes. *Clin Infect Dis.* 38(8):1067-74.
5. Amábile-Cuevas C. (2010): Antibiotic resistance in Mexico: a brief overview of the current status and its causes. *J Infect Dev Ctries.* 4(3):126-31.
6. Ambler RP (1980): The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 289(1036):321-31.
7. Asai T, Masani K, Sato C, Hiki M, Usui M, Baba K, Ozawa M, Harada K, Aoki H, Sawada T. (2011): Phylogenetic groups and cephalosporin resistance genes of *Escherichia coli* from diseased food-producing animals in Japan. *Acta Vet Scand.* 53:52: 1-5.
8. Ball P. (2000): Quinolone generations: natural history or natural selection? *J Antimicrob Chemother.* 46 Suppl T1:17-24.
9. Barlow M, Hall BG (2002): Origin and evolution of the AmpC β -lactamases of *Citrobacter freundii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 46(5):1190-98.

10. Bauernfeind A, Chong Y, Schweighart S. (1989): Extended broad spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection*. 17(5):316-21.
11. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Ernst S, Casellas JM. (1996): Sequences of β -lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 40(2):509-13.
12. Blanche F, Cameron B, Bernard FX, Maton L, Manse B, Ferrero L, Ratet N, Lecoq C, Goniot A, Bisch D, Crouzet J. (1996): Differential behaviors of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* type II DNA topoisomerases. *Antimicrob Agents Chemother*. 40(12):2714-20.
13. Bobrowski MM, Matthew M, Barth PT, Datta N, Grinter NJ, Jacob AE, Kontomichalou P, Dale JW, Smith JT. (1976): Plasmid-determined β -lactamase indistinguishable from the chromosomal β -lactamase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 125(1):149-57.
14. Bonnet R. (2004) Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes *Antimicrob Agents Chemother*. 48(1):1-14.
15. Bush K, Fisher JF. (2011): Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 65: 455-78.
16. Bush K, Jacoby GA. (2010): Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 54(3):969-76.
17. Carattoli A. (2008): Animal reservoirs for extended spectrum β -lactamase producers. *Clin Microbiol Infect*. 14 Suppl 1:117-23.
18. Castillo-Vera J, Ribas-Aparicio RM, Nicolau CJ, Oliver A, Osorio-Carranza L, Aparicio-Ozores G. (2012): Unusual diversity of acquired β -lactamases in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a Mexican hospital. *Microb Drug Resist*. 18(5):471-78.

19. Cattoir V, Poirel L, Nordmann P. (2008): Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother.* 52(10):3801-04.
20. Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordmann P. (2007): Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother.*, 60(2):394-97.
21. Cavaco LM, Hasman H, Xia S, Aarestrup FM. (2009): *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(2):603-08.
22. Cengiz M, Buyukcangaz E, Arslan E, Mat B, Sahinturk P, Sonal S, Gocmen H, Sen A. (2012): Molecular characterisation of quinolone resistance in *Escherichia coli* from animals in Turkey. *Vet Rec.* 171(6):155, 1-4.
23. Chander Y, Oliveira S, Goyal SM. (2011): Characterisation of ceftiofur resistance in swine bacterial pathogens. *Vet J.* 187(1):139-41.
24. Chen X, Zhang W, Pan W, Yin J, Pan Z, Gao S, Jiao X. (2012): Prevalence of *qnr*, *aac(6)-Ib-cr*, *qepA*, and *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and the environment. *Antimicrob Agents Chemother.* 56(6):3423-27.
25. CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) (2012a): *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*, 19th edition, Approved Standard M02-A11. Wayne, PA, USA.
26. CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) (2012b): *Performance Standards for Antimicrobial Suceptibility Testing*, 22nd informational supplement. M100-S22. Wayne, PA, USA.
27. Corbett KD, Schoeffler AJ, Thomsen ND, Berger JM. (2005): The structural basis for substrate specificity in DNA topoisomerase IV. *J Mol Biol.* 351(3):545-61.
28. Dalkmann P, Broszat M, Siebe C, Willaschek E, Sakinc T, Huebner J, Amelung W, Grohmann E, Siemens J. (2012): Accumulation of pharmaceuticals, *Enterococcus*,

- and resistance genes in soils irrigated with wastewater for zero to 100 years in central Mexico. *PLoS One*. 7(9):e45397. doi: 10.1371/journal.pone.0045397. Epub 2012 Sep 25.
29. Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. (2010): Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.*, 65(3):490-95.
 30. de Jong A, Thomas V, Klein U, Marion H, Moyaert H, Simjee S, Vallé M. (2013): Pan-European resistance monitoring programmes encompassing food-borne bacteria and target pathogens of food-producing and companion animals. *Int J Antimicrob Agents*. 41(5):403-09.
 31. De Medici D, Croci L, Delibato E, Di Pasquale S, Filetici E, Toti L. (2003): Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR green I real-time PCR to detect *Salmonella enterica* serotype enteritidis in poultry. *Appl Environ Microbiol*. 69(6):3456-61.
 32. Doi Y, Paterson DL, Egea P, Pascual A, López-Cerero L, Navarro MD, Adams-Haduch JM, Qureshi ZA, Sidjabat HE, Rodríguez-Baño J. (2010): Extended-spectrum and CMY-type β -lactamase-producing *Escherichia coli* in clinical samples and retail meat from Pittsburgh, USA and Seville, Spain. *Clin Microbiol Infect*. 16(1):33-38.
 33. Dolejska M, Jurcickova Z, Literak I, Pokludova L, Bures J, Hera A, Kohoutova L, Smola J, Cizek A. (2011): IncN plasmids carrying bla_{CTX-M-1} in *Escherichia coli* isolates on a dairy farm. *Vet Microbiol*. 149(3-4):513-16.
 34. Donaldson SC, Straley BA, Hegde NV, Sawant AA, DebRoy C, Jayarao BM. (2006): Molecular epidemiology of ceftiofur-resistant *Escherichia coli* isolates from dairy calves. *Appl Environ Microbiol*. 72(6):3940-48.
 35. Drlica K, Zhao X. (1997): DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev*. 61(3):377-92.
 36. Egervärn M, Börjesson S, Byfors S, Finn M, Kaipe C, Englund S, Lindblad M. (2014): *Escherichia coli* with extended-spectrum β -lactamases or transferable

- AmpC β -lactamases and *Salmonella* on meat imported into Sweden. *Int J Food Microbiol.* 171:8-14.
37. Ewers C, Bethe A, Semmler T, Guenther S, Wieler LH. (2012): Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clin Microbiol Infect.* 18(7):646-55.
 38. Fàbrega A, Sánchez-Céspedes J, Soto S, Vila J. (2008): Quinolone resistance in the food chain. *Int J Antimicrob Agents.* 31(4):307-15.
 39. Farmer JJ III. *Enterobacteriaceae: Introduction and Identification*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC y Tenover RH. (eds) (1999): *Manual of Clinical Microbiology*, 7^a edición, American Society for Microbiology, Washington, DC.
 40. Ferrari R, Galiana A, Cremades R, Rodriguez JC, Magnani M, Tognim MC, Oliveira TC, Royo G. (2011): Plasmid-mediated quinolone resistance by genes *qnrA1* and *qnrB19* in *Salmonella* strains isolated in Brazil. *J Infect Dev Ctries.* 5(6):496-98.
 41. Fey PD, Safranek TJ, Rupp ME, Dunne EF, Ribot E, Iwen PC, Bradford PA, Angulo FJ, Hinrichs SH. (2000): Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from cattle. *N Engl J Med.* 342(17):1242-49.
 42. Filioussis G, Tzivara A, Petridou E, Giadinis ND, Burriel AR, Kritas SK. (2013): Ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* isolated from the intestinal microbiota of goats in Greece in the absence of selective pressure. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 76(3):352-55.
 43. Fortini D, Fashae K, García-Fernández A, Villa L, Carattoli A. (2011): Plasmid-mediated quinolone resistance and β -lactamases in *Escherichia coli* from healthy animals from Nigeria. *J Antimicrob Chemother.* 66(6):1269-72.
 44. Frye JG, Jackson CR. (2013): Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp. isolated from U.S. food animals. *Front Microbiol.* 4:135. doi:10.3389/fmicb.2013.00135. eCollection 2013.

45. Fuentes-Arriaga R, Talavera-Rojas M, Vázquez-Navarrete J, Soriano-Vargas E, Gutiérrez-Castillo 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. *Vet Mex.* 44(1): 23-30.
46. Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. (2012): Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 73(4):354-60.
47. Garza-González E, Mendoza Ibarra SI, Llaca-Díaz JM, González GM. (2011): Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* isolates at a tertiary-care centre in Monterrey, Mexico. *J Med Microbiol.* 60(Pt 1):84-90.
48. Glenn LM, Englen MD, Lindsey RL, Frank JF, Turpin JE, Berrang ME, Meinersmann RJ, Fedorka-Cray PJ, Frye JG. (2012): Analysis of antimicrobial resistance genes detected in multiple-drug-resistant *Escherichia coli* isolates from broiler chicken carcasses. *Microb Drug Resist.* 18(4):453-63.
49. González-Villa M, Ribas-Aparicio RM, Coria-Jiménez R, Donis-Rocandio JE, Aparicio-Ozores G. (2012): Detection of extended spectrum β -lactamase OXA-141 in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 30(9):535-41.
50. Gupta V. (2007): An update on newer β -lactamases. *Indian J Med Res.* 126(5):417-27.
51. Haenni M, Châtre P, Métayer V, Bour M, Signol E, Madec JY, Gay E. (2014): Comparative prevalence and characterization of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in dominant versus subdominant enteric flora in veal calves at slaughterhouse, France. *Vet Microbiol.* pii: S0378-1135(14)00113-18.
52. Hammerum AM, Heuer OE. (2009): Human health hazards from antimicrobial-resistant *Escherichia coli* of animal origin. *Clin Infect Dis.* 48(7):916-21.

53. Harada K, Asai T. (2010): Role of antimicrobial selective pressure and secondary factors on antimicrobial resistance prevalence in *Escherichia coli* from food-producing animals in Japan. *J Biomed Biotechnol.* 2010:180682. doi: 10.1155/2010/180682. Epub 2010 Jun 2.
54. Harada S, Ishii Y, Yamaguchi K. (2008): Extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical laboratory and therapy. *Korean J Lab Med.* 28(6):401-12.
55. Hata M, Suzuki M, Matsumoto M, Takahashi M, Sato K, Ibe S, Sakae K. (2005): Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(2):801-03.
56. Hawkey PM (2003): Mechanisms of quinolone action and microbial response. *J Antimicrob Chemother.* 51Suppl S1: 29-35.
57. Heijnen L, Medema G. (2006): Quantitative detection of *E. coli*, *E. coli* O157 and other Shiga toxin producing *E. coli* in water samples using a culture method combined with real-time PCR. *J Water Health.* 4 (4): 487-98.
58. Higgins PG, Pérez-Llarena FJ, Zander E, Fernández A, Bou G, Seifert H. (2013): OXA-235, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 57(5):2121-26.
59. Ho PL, Chow KH, Lai EL, Lo WU, Yeung MK, Chan J, Chan PY, Yuen KY. (2011): Extensive dissemination of CTX-M-producing *Escherichia coli* with multidrug resistance to 'critically important' antibiotics among food animals in Hong Kong, 2008-10. *J Antimicrob Chemother.* 66(4):765-68.
60. Hooper DC (2000): Mechanisms of Action and Resistance of Older and Newer Fluoroquinolones. *Clin Infect Dis.* 31Suppl 2: S24-28.
61. Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. (2005): Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int J Antimicrob Agents.* 25(5):358-73.
62. Horakova K, Mlejnkova H, Mlejnek P. J. (2008): Specific detection of *Escherichia coli* isolated from water samples using polymerase chain reaction targeting four

- genes: cytochrome bd complex, lactose permease, β -D-glucuronidase, and β -D-galactosidase. *Appl Microbiol.* 105(4):970-76.
63. Hoshino K, Kitamura A, Morrissey I, Sato K, Kato J, Ikeda H. (1994): Comparison of Inhibition of *Escherichia coli* Topoisomerase IV by Quinolones with DNA Gyrase Inhibition. *Antimicrob Agents Chemother.* 38(11):2623-27.
 64. Huang SY, Zhu XQ, Wang Y, Liu HB, Dai L, He JK, Li BB, Wu CM, Shen JZ. (2012): Co-carriage of *qnrS1*, *floR*, and *bla*_(CTX-M-14) on a multidrug-resistant plasmid in *Escherichia coli* isolated from pigs. *Foodborne Pathog Dis.* 9(10):896-01.
 65. Ingram PR, Rogers BA, Sidjabat HE, Gibson JS, Inglis TJ. (2013): Co-selection may explain high rates of ciprofloxacin non-susceptible *Escherichia coli* from retail poultry reared without prior fluoroquinolone exposure. *J Med Microbiol.* 62(Pt 11):1743-46.
 66. Ishida Y, Ahmed AM, Mahfouz NB, Kimura T, El-Khodery SA, Moawad AA, Shimamoto T. (2010): Molecular analysis of antimicrobial resistance in gram-negative bacteria isolated from fish farms in Egypt. *J Vet Med Sci.* 72(6):727-34.
 67. Ishii Y, Ohno A, Taguchi H, Imajo S, Ishiguro M, Matsuzawa H. (1995): Cloning and Sequence of the Gene Encoding a Cefotaxime Hydrolyzing Class A β -Lactamase Isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 39(10):2269-75.
 68. Jacoby GA, Cattoir V, Hooper D, Martínez-Martínez L, Nordmann P, Pascual A, Poirel L, Wang M. (2008): *qnr* Gene nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother.* 52(7):2297-99.
 69. Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM, Walker VJ, Oh H, Robicsek A, Hooper DC. (2006): *qnrB*, Another Plasmid-Mediated Gene for Quinolone Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(4):1178-82.
 70. Jacoby GA. (2006): β -lactamase nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(4):1123-29.
 71. Jacoby GA. (2009): AmpC β -lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 22(1):161-82.

72. Jiang HX, Tang D, Liu YH, Zhang XH, Zeng ZL, Xu L, Hawkey PM. (2012): Prevalence and characteristics of β -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from farmed fish in China. *J Antimicrob Chemother.* 67(10):2350-53.
73. Kaesbohrer A, Schroeter A, Tenhagen BA, Alt K, Guerra B, Appel B. (2012): Emerging antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* with public health relevance. *Zoonoses Public Health.* 59 Suppl 2:158-65.
74. Kawanishi M, Ozawa M, Hiki M, Abo H, Kojima A, Asai T. (2013): Detection of *aac(6')-Ib-cr* in avian pathogenic *Escherichia coli* isolates in Japan. *J Vet Med Sci.* 75(11):1539-42.
75. Khodursky AB, Zechiedrich EL, Cozzarelli NR. (1995): Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92(25):11801-05.
76. Kim JH, Cho JK, Kim KS. (2013): Prevalence and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Salmonella* isolated from poultry in Korea. *Avian Pathol.* 42(3):221-29.
77. Kirchner M, Wearing H, Teale C. (2011): Plasmid-mediated quinolone resistance gene detected in *Escherichia coli* from cattle. *Vet Microbiol.* 148(2-4):434-35.
78. Kojima A, Asai T, Ishihara K, Morioka A, Akimoto K, Sugimoto Y, Sato T, Tamura Y, Takahashi T. (2009): National monitoring for antimicrobial resistance among indicator bacteria isolated from food-producing animals in Japan. *J Vet Med Sci.* 71(10):1301-08.
79. Koo HJ, Woo GJ. (2012): Characterization of antimicrobial resistance of *Escherichia coli* recovered from foods of animal and fish origin in Korea. *J Food Prot.* 75(5):966-72.
80. Lee y Aliabadi. Antimicrobianos que inhiben la función de los ácidos nucleicos. En: Botana LM, Landoni MF, Martín-Jiménez T. (eds) (2002): *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*, McGraw-Hill Interamericana, 1ª edición, Madrid, España.
81. Li XZ, Mehrotra M, Ghimire S, Adewoye L. (2007): β -Lactam resistance and β -lactamases in bacteria of animal origin. *Vet Microbiol.* 121(3-4):197-14.

82. Liu JH, Deng YT, Zeng ZL, Gao JH, Chen L, Arakawa Y, Chen ZL. (2008): Coprevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QepA, Qnr, and AAC(6')-Ib-cr among 16S rRNA methylase RmtB-producing *Escherichia coli* isolates from pigs. *Antimicrob Agents Chemother.* 52(8):2992-93.
83. Livermore DM (2003): Bacterial Resistance: Origins, Epidemiology, and Impact. *Clin Infect Dis.* 36(Suppl 1):S11-23.
84. Livermore DM. (1995): β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 8(4): 557-58.
85. Livermore DM. (2012): Fourteen years in resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 39(4):283-94.
86. López HSS y Camberos LO. (2006): Farmacología Veterinaria, 3ª ed., McGraw-Hill Interamericana, México.
87. Ma J, Zeng Z, Chen Z, Xu X, Wang X, Deng Y, Lü D, Huang L, Zhang Y, Liu J, Wang M. (2009): High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, and *qepA* among ceftiofur-resistant Enterobacteriaceae isolates from companion and food-producing animals. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(2):519-24.
88. Madec JY, Lazizzera C, Châtre P, Meunier D, Martin S, Lepage G, Ménard MF, Lebreton P, Rambaud T (2008): Prevalence of fecal carriage of acquired expanded-spectrum cephalosporin resistance in *Enterobacteriaceae* strains from cattle in France. *J Clin Microbiol.* 46(4):1566-67
89. Madec JY, Poirel L, Saras E, Gourguechon A, Girlich D, Nordmann P, Haenni M. (2012): Non-ST131 *Escherichia coli* from cattle harbouring human-like *bla*_(CTX-M-15)-carrying plasmids. *J Antimicrob Chemother.* 67(3):578-81.
90. Madigan MT, Martinko JM y Parker J. (2004): Brock, Biología de los Microorganismos, 10ª ed., Pearson Prentice Hall, España.
91. Maheux AF, Picard FJ, Boissinot M, Bissonnette L, Paradis S, Bergeron MG. (2009): Analytical comparison of nine PCR primer sets designed to detect the presence of *Escherichia coli/Shigella* in water samples. *Water Res.* 43(12):3019-28.

92. Martinez JL. (2009): Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ Pollut.* 157(11):2893-02.
93. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. (1998): Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet.* 351(9105):797-99.
94. Martín-Jiménez T. Antimicrobianos que actúan en la pared bacteriana. En: Botana LM, Landoni MF, Martín-Jiménez T. (eds) (2002): *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*, 1ª edición, McGraw-Hill Interamericana, Madrid, España.
95. Matsumoto Y, Ikeda F, Kamimura T, Yokota Y, Mine Y. (1988): Novel Plasmid-Mediated 3-Lactamase from *Escherichia coli* That Inactivates Oxyimino-Cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 32 (8): 1243-46.
96. Montes de Oca AS. (2011): Sensibilidad in vitro de cepas de *Escherichia coli* hemolítica aisladas de canales de bovinos en el Estado de México. Tesis de Licenciatura, FMVZ, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México.
97. Morfín-Otero R, Mendoza-Olazarán S, Silva-Sánchez J, Rodríguez-Noriega E, Laca-Díaz J, Tinoco-Carrillo P, Petersen L, López P, Reyna-Flores F, Alcantar-Curiel D, Garza-Ramos U, Garza-González E. (2013): Characterization of *Enterobacteriaceae* isolates obtained from a tertiary care hospital in Mexico, which produces extended-spectrum β -lactamase. *Microb Drug Resist.* 19(5):378-83.
98. Muro S, Garza-González E, Camacho-Ortiz A, González GM, Laca-Díaz JM, Bosques F, Rositas F. (2012): Risk factors associated with extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* nosocomial bloodstream infections in a tertiary care hospital: a clinical and molecular analysis. *Chemotherapy.* 58(3):217-24.
99. Pan XS, Fisher LM. (1997): Targeting of DNA gyrase in *Streptococcus pneumoniae* by sparfloxacin: selective targeting of gyrase or topoisomerase IV by quinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* 41(2):471-74.

100. Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. (2006): Prevalence in the United States of *aac(6')-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(11):3953-55.
101. Paterson DL, Bonomo RA. (2005): Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 18(4):657-86.
102. Perez-Montaña JA, Gonzalez-Aguilar D, Barba J, Pacheco-Gallardo C, Campos-Bravo CA, Garcia S, Heredia NL, Cabrera-Diaz E. (2012): Frequency and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes on beef carcasses at small abattoirs in Jalisco State, Mexico. *J Food Prot.* 75(5):867-73.
103. Périchon B, Courvalin P, Galimand M. (2007): Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 51(7):2464-69.
104. Pfaller MA, Segreti J. (2006): Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum β -lactamases. *Clin Infect Dis.* 42 Suppl 4:S153-63.
105. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. (2002): Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 46(1):1-11.
106. Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. (2005): Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. *J Antimicrob Chemother.* 56(1):52-59.
107. Poirel L, Cattoir V, Nordmann P. (2012): Plasmid-Mediated Quinolone Resistance; Interactions between Human, Animal, and Environmental Ecologies. *Front Microbiol.* 3:24: 1-7.
108. Ponce-Rivas E, Muñoz-Márquez ME, Khan AA. (2012): Identification and molecular characterization of class 1 integrons in multiresistant *Escherichia coli* isolates from poultry litter. *Appl Environ Microbiol.* 78(15):5444-47.

109. Prescott JF. β -lactam Antibiotics: Penam Penicillins. En: Giguère S, Prescott JF, Baggot JD, Walker RD, Dowling PM. (eds) (2007): Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, 4th ed., Blackwell Publishing, USA.
110. Ramirez MS, Nikolaidis N, Tolmasky ME. (2013): Rise and dissemination of aminoglycoside resistance: the aac(6')-Ib paradigm. *Front Microbiol.* 4:121. doi: 10.3389/fmicb.2013.00121. eCollection 2013.
111. Ramirez MS, Tolmasky ME. (2010): Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat.* 13(6):151-71.
112. Reyes-Rodríguez NE, Talavera-Rojas M, Varela-Guerrero JA, Barba-León J, Gutiérrez-Castillo A del C, Alonso-Fresán U. (2013): Prevalence and antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from bovine carcasses at slaughterhouses of the Central Mexican Plateau. *Rev Mex Cienc Pecu,* 4(2):235-42.
113. Reyna-Flores F, Barrios H, Garza-Ramos U, Sánchez-Pérez A, Rojas-Moreno T, Uribe-Salas FJ, Fagundo-Sierra R, Silva-Sanchez J. (2013): Molecular epidemiology of *Escherichia coli* O25b-ST131 isolates causing community-acquired UTIs in Mexico. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 76(3):396-98.
114. Rice LB (2008): Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis,* 197(8):1079-81.
115. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. (2006a): The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis.* 6(10):629-40.
116. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, Bush K, Hooper DC. (2006b): Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med.* 12(1):83-88.
117. Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, Pascual A, García I, Martínez-Martínez L. (2006): Correlation of quinolone resistance levels and differences in basal and quinolone-induced expression from three *qnrA*-containing plasmids. *Clin Microbiol Infect.* 12(5):440-45.

118. Rubtsova MY, Ulyashova MM, Bachmann TT, Schmid RD, Egorov AM. (2010): Multiparametric Determination of Genes and Their Point Mutations for Identification of β -Lactamases. *Biochemistry (Mosc)*. 75(13):1628-49.
119. Sánchez-Martínez G, Garza-Ramos UJ, Reyna-Flores FL, Gaytán-Martínez J, Lorenzo-Bautista IG, Silva-Sanchez J. (2010): In169, a new class 1 integron that encoded *bla*_(IMP-18) in a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Mexico. *Arch Med Res*. 41(4):235-39.
120. Sandt CH, Fedorka-Cray PJ, Tewari D, Ostroff S, Joyce K, M'ikanatha NM. (2013): A comparison of non-typhoidal *Salmonella* from humans and food animals using pulsed-field gel electrophoresis and antimicrobial susceptibility patterns. *PLoS One*. 8(10):e77836. doi: 10.1371/journal.pone.0077836. eCollection 2013.
121. Schink AK, Kadlec K, Schwarz S. (2012): Detection of *qnr* genes among *Escherichia coli* isolates of animal origin and complete sequence of the conjugative *qnrB19*-carrying plasmid pQNR2078. *J Antimicrob Chemother*. 67(5):1099-02.
122. Seiffert SN, Hilty M, Perreten V, Endimiani A. (2013): Extended-spectrum cephalosporin-resistant Gram-negative organisms in livestock: an emerging problem for human health? *Drug Resist Updat*. 16(1-2):22-45.
123. Silva J, Aguilar C, Ayala G, Estrada MA, Garza-Ramos U, Lara-Lemus R, Ledezma L. (2000): TLA-1: a new plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 44(4):997-03.
124. Silva J, Aguilar C, Becerra Z, López-Antuñano F, García R. (1999): Extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of enterobacteria in Mexico. *Microb Drug Resist*. 5(3):189-93.
125. Silva-Sánchez J, Aguilar-Zacarías C. (1997): β -Lactamase bioassay: a simplified method to determine extended-spectrum β -lactamases (ESBL) in enterobacteria. *Arch Med Res*. 28(2):285-87.
126. Silva-Sanchez J, Barrios H, Reyna-Flores F, Bello-Diaz M, Sanchez-Perez A, Rojas T; Bacterial Resistance Consortium, Garza-Ramos U. (2011): Prevalence and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-

- spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates in Mexico. *Microb Drug Resist.* 17(4):497-05.
127. Stockwell VO, Duffy B. (2012): Use of antibiotics in plant agriculture. *Rev Sci Tech.* 31(1):199-10.
 128. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. (2009): Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev.* 22(4):664-89.
 129. Szmolka A, Fortini D, Villa L, Carattoli A, Anjum MF, Nagy B. (2011): First report on IncN plasmid-mediated quinolone resistance gene *qnrS1* in porcine *Escherichia coli* in Europe. *Microb Drug Resist.* 17(4):567-73.
 130. Tillotson GS. (1996): Quinolones: structure-activity relationships and future predictions. *J Med Microbiol.* 44(5):320-24.
 131. Turner PJ. (2005): Extended-spectrum β -lactamases. *Clin Infect Dis.* 41 Suppl 4:S273-75.
 132. Varela-Guerrero JA, Talavera-Rojas M, Gutiérrez-Castillo Adel C, Reyes-Rodríguez NE, Vázquez-Guadarrama J. (2013): Phenotypic-genotypic resistance in *Salmonella* spp. isolated from cattle carcasses from the north central zone of the State of Mexico. *Trop Anim Health Prod.* 45(4):995-00.
 133. Veldman K, Cavaco LM, Mevius D, Battisti A, Franco A, Botteldoorn N, Bruneau M, Perrin-Guyomard A, Cerny T, De Frutos Escobar C, Guerra B, Schroeter A, Gutierrez M, Hopkins K, Myllyniemi AL, Sunde M, Wasyl D, Aarestrup FM. 2011. International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. *J Antimicrob Chemother.* 66(6):1278-1286.
 134. Veldman K, van Essen-Zandbergen A, Kant A, Mevius D. (2012): Characterization of qnr-positive *Escherichia coli* isolates from food-producing animals in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother.* 67(1):239-40.

135. Vetting MW, Hegde SS, Wang M, Jacoby GA, Hooper DC, Blanchard JS. (2011): Structure of QnrB1, a plasmid-mediated fluoroquinolone resistance factor. *J Biol Chem.* 286(28):25265-73.
136. Walker RD, Dowling PM. Fluoroquinolones. En: Giguère S, Prescott JF, Baggot JD, Walker RD, Dowling PM. (eds) (2007): *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, 4^a edición, Blackwell Publishing, USA.
137. Wang M, Guo Q, Xu X, Wang X, Ye X, Wu S, Hooper DC, Wang M. (2009): New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(5):1892-97.
138. Wasyl D, Hoszowski A, Zając M, Szulowski K. (2013): Antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* isolated from animals at slaughter. *Front Microbiol.* 4:221. doi: 10.3389/fmicb.2013.00221.
139. Webber M, Piddock LJ. (2001): Quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Vet Res.* 32(3-4):275-84.
140. Xiong X, Bromley EH, Oelschlaeger P, Woolfson DN, Spencer J. (2011): Structural insights into quinolone antibiotic resistance mediated by pentapeptide repeat proteins: conserved surface loops direct the activity of a Qnr protein from a gram-negative bacterium. *Nucleic Acids Res.* 39(9):3917-27.
141. Xu X, Wu S, Ye X, Liu Y, Shi W, Zhang Y, Wang M. (2007): Prevalence and expression of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrA1*. *Antimicrob Agents Chemother.* 51(11):4105-10.
142. Xu X, Cui S, Zhang F, Luo Y, Gu Y, Yang B, Li F, Chen Q, Zhou G, Wang Y, Pang L, Lin L. (2014): Prevalence and characterization of cefotaxime and ciprofloxacin co-resistant *Escherichia coli* isolates in retail chicken carcasses and Ground Pork, China. *Microb Drug Resist.* 20(1):73-81.
143. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Arakawa Y. (2008): Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 52(4):1564-66.

144. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Konda T, Arakawa Y. (2007): New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 51(9):3354-60.
145. Zaidi MB, Leon V, Canche C, Perez C, Zhao S, Hubert SK, Abbott J, Blickenstaff K, McDermott PF. (2007): Rapid and widespread dissemination of multidrug-resistant bla_{CMY-2} *Salmonella* Typhimurium in Mexico. *J Antimicrob Chemother.* 60(2):398-01.
146. Zeng X, Lin J. (2013): β -lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Front Microbiol.*4:128. doi: 10.3389/fmicb.2013.00128. eCollection 2013.
147. Zhao S, Blickenstaff K, Bodeis-Jones S, Gaines SA, Tong E, McDermott PF. (2012): Comparison of the prevalences and antimicrobial resistances of *Escherichia coli* isolates from different retail meats in the United States, 2002 to 2008. *Appl Environ Microbiol.* 78(6):1701-07.
148. Zheng H, Zeng Z, Chen S, Liu Y, Yao Q, Deng Y, Chen X, Lv L, Zhuo C, Chen Z, Liu JH. (2012): Prevalence and characterisation of CTX-M β -lactamases amongst *Escherichia coli* isolates from healthy food animals in China. *Int J Antimicrob Agents.* 39(4):305-10.

XII. ANEXOS

ANEXO 1: Extracción de ADN para pruebas de PCR:

El ADN bacteriano se obtuvo con la técnica de ebullición descrito anteriormente (De Medici *et al.*, 2003), a la cual se le hicieron algunas modificaciones como se describe a continuación: se incubó 3 mL del microorganismo a estudiar a 37 °C durante 16±18 h en caldo BHI y con una micropipeta se tomó 1 mL y se depositó en un vial de 1.5 mL, posteriormente se centrifugó 5 min a 10,000 rpm hasta formarse un pellet de bacteria, se desechó el sobrenadante y se agregó 400 µL de agua destilada en el vial, la muestra se agitó en un vortex hasta deshacerse el pellet, nuevamente se centrifugó 5 min a 10,000 rpm, se desechó el sobrenadante y se adicionaron 100µL de agua destilada, a continuación se agitó nuevamente en el vortex hasta deshacerse el pellet y se puso en agua en ebullición (95 °C – 100 °C) durante 15 min. Finalmente, se centrifugó ligeramente el vial y se extrajo con una micropipeta el sobrenadante teniendo cuidado de no succionar el pellet y se colocó en un vial nuevo y se almacenó a –20 °C.

ANEXO 2: Reactivos empleados para la PFGE:

0.5 M EDTA, pH 8.0:

- 1000 mL de agua ultrapura estéril
- 186.1 g de EDTA

*Esterilizar

1M Tris, pH 8.0:

- 1000 mL de agua ultrapura estéril
- 121.1 g de base Tris

*Emplear frasco estéril

Buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0):

- 10 mL de 1 M Tris, pH 8.0
- 2 mL de 0.5 M EDTA, pH 8.0
- Agregar agua ultrapura estéril hasta alcanzar un volumen de 1000 mL

*Esterilizar

Buffer de suspensión celular (CSB) (100 mM Tris: 100 mM EDTA, pH 8.0):

- 10 mL de 1 M Tris, pH 8.0
- 20 mL de 0.5 M EDTA, pH 8.0
- Agregar agua ultrapura estéril hasta alcanzar un volumen de 100 mL

*Emplear frasco estéril

Buffer de lisis celular (CLB) (50 mM Tris: 50 mM EDTA, pH 8.0 + 1% de sarcosil):

- 25 mL de 1 M Tris, pH 8.0
- 50 mL de 0.5 M EDTA, pH 8.0
- 50 mL de 1% de sarcosil
- Agregar agua ultrapura estéril hasta alcanzar un volumen de 500 mL

*Emplear frasco estéril

1% de Sarcosil (N-Laurylsarcosine Sodium Salt):

- 1000 mL de agua ultrapura estéril
- 10 g de sarcosil

*Emplear frasco estéril

TBE 10X:

- 54 g de base Tris
- 27.5 g de ácido bórico

- 20 ml de 0.5 M EDTA, pH 8.0
 - Agregar agua ultrapura estéril hasta alcanzar un volumen de 500 mL
- *Esterilizar y conservar en refrigeración

TBE 0.5x (a partir de TBE 10X):

- 25 mL de TBE 10X
- Agregar agua ultrapura estéril hasta alcanzar un volumen de 500 mL

SDS 20%:

- 80 mL de agua ultrapura estéril
- 20 g de SDS