

Evaluación de la resistencia a la colistina a partir de aislamientos de *Escherichia coli* (E. Coli) en cerdos de México

Avaliação da resistência à colistina de isolados de *Escherichia coli* (E. coli) em porcos do México

DOI: 10.34188/bjaerv6n1-061

Recebimento dos originais: 20/12/2022

Aceitação para publicação: 02/01/2023

Fragoso Zamora Paulina

Medica veterinaria zootecnista por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM),

Institución: Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdo (DMZC) Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México

Dirección: Av. Universidad #3000, Ciudad Universitaria (C.U.), Coyoacán, CP 04510 Ciudad de México

Correo electrónico: paulina103d@gmail.com

Galván Pérez María del Rosario Esperanza

Médica Veterinaria Zootecnista por la FMVZ de la UNAM

Maestra en Ciencias de la Salud y Producción Animal por la FMVZ de la UNAM

Institución: Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdo de la FMVZ de la UNAM

Dirección: Av. Universidad #3000, Ciudad Universitaria (C.U), Coyoacán, CP 04510 Ciudad de México

Correo electrónico: galvanesper2@hotmail.com

Roberto Gustavo Martínez Gamba

MVZ MC

Médico Veterinario Zootecnista por la FMVZ de la UNAM

Maestro en Ciencias de la Salud y Producción Animal por la FMVZ de la UNAM

Institución: Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdo de la FMVZ de la UNAM

Dirección: Av. Universidad #3000, Ciudad Universitaria (C.U), Coyoacán, CP 04510 Ciudad de México

Correo electrónico: rmgamba@yahoo.com.mx

Marco Antonio Herradora Lozano

MVZ MPA

Médico Veterinario Zootecnista por la FMVZ de la UNAM

Maestro en Producción Animal por la FMVZ de la UNAM

Institución: Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdo de la FMVZ de la UNAM

Dirección: Av. Universidad #3000, Ciudad Universitaria (C.U), Coyoacán, CP 04510 Ciudad de México

Correo electrónico: ma_hl@hotmail.com

RESUMEN

La colistina es un antibiótico que ha sido utilizado en la producción porcina como tratamiento y prevención de enfermedades digestivas, entre ellas, las causadas por *Escherichia coli*. Este trabajo permite conocer la frecuencia de resistencia a la colistina en México, obtenida mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC por sus siglas en inglés) de acuerdo con las recomendaciones del CLSI-EUCAST (MIC <2 µg/mL). Fueron 302 aislamientos provenientes de cerdos enfermos pertenecientes a granjas tecnificadas, remitidos al Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos de la UNAM, en el periodo del 2003 al 2018. Los aislamientos recuperados corresponden a Veracruz (48 %), Puebla (38 %), Ciudad de México (7 %), Estado de México (3 %), Querétaro (3 %) y Aguascalientes (1 %). En México el nivel de resistencia a este antibiótico fue de 43.04 %, con una MIC₅₀ y MIC₉₀ de 2 µg/mL y 128 µg/mL, respectivamente. Veracruz fue el estado con mayor resistencia (46.87 %) y con la MIC₉₀ más alta (128 µg/mL). En el estado de Puebla la resistencia fue de 35.92 % con una MIC₉₀ de 16 µg/mL, mientras que para la zona centro se observa como gradualmente la MIC va siendo mayor. En la Ciudad de México un aislado del 2006 tenía una MIC de 0.5 µg/mL, mientras que para el 2017-2018 la MIC₅₀ aumentó a 4 µg/mL y la MIC₉₀ a 8 µg/mL. Los resultados obtenidos sugieren que el uso y exposición prolongada a un antibiótico generará resistencia.

Palabras clave: Colistina, resistencia antimicrobiana, RAM, cerdos, *e. coli*

RESUMO

A colistina é um antibiótico que tem sido utilizado na produção de suínos como tratamento e prevenção de doenças digestivas, incluindo as causadas pela *Escherichia coli*. Este estudo fornece informações sobre a frequência da resistência à colistina no México, obtida pela determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) de acordo com as recomendações do CLSI-EUCAST (MIC <2 µg/mL). Houve 302 isolados de suínos doentes pertencentes a fazendas tecnificadas, submetidos ao Departamento de Medicina y Zootecnia Porcina da Universidad Nacional Autónoma de México, no período de 2003 a 2018. Os isolados recuperados correspondem a Veracruz (48 %), Puebla (38 %), Ciudad de México (7 %), Estado de México (3 %), Querétaro (3 %) e Aguascalientes (1 %). No México, o nível de resistência a este antibiótico foi de 43,04 %, com MIC₅₀ e MIC₉₀ de 2 µg/mL e 128 µg/mL, respectivamente. Veracruz foi o estado com a maior resistência (46,87%) e o maior MIC₉₀ (128 µg/mL). No estado de Puebla, a resistência foi de 35,92% com um MIC₉₀ de 16 µg/mL, enquanto para a zona central, o MIC está aumentando gradualmente. Na Ciudad de México, um isolado de 2006 tinha um MIC de 0,5 µg/mL, enquanto para 2017-2018 o MIC₅₀ aumentou para 4 µg/mL e o MIC₉₀ para 8 µg/mL. Os resultados obtidos sugerem que o uso prolongado e a exposição a um antibiótico gerarão resistência.

Palavras-chave: Colistina, resistência antimicrobiana, RAM, porcos, *e. coli*

1 INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas que tiene la producción intensiva porcina es el manejo sanitario, que tiene como finalidad la prevención y el control de enfermedades en las diferentes etapas productivas. En la actualidad se cuenta con herramientas diagnósticas, como la bacteriología veterinaria, que permite al médico veterinario zootecnista resolver los problemas que afectan la salud animal, pública y, por ende, la producción.

Una de las etapas en las que se debe tener especial cuidado del estatus sanitario es durante las primeras semanas de vida del lechón, ya que la presentación de enfermedades repercute de forma directa sobre el número de lechones destetados, para el posterior crecimiento en la engorda. Las patologías digestivas son una de las principales causas de mortalidad en esta etapa. (1) La presentación de diarrea asociada con *Escherichia coli* (*E. coli*) puede ocurrir en lechones a pocos días del nacimiento o bien, después del destete. El patotipo más relevante es el Enterotoxigénico (ETEC) (2), cuando la presentación clínica se manifiesta como toxemia, en la llamada “enfermedad del edema”. (3)

La administración de antimicrobianos es frecuente para el tratamiento contra *E. coli*. A lo largo de la historia se han agregado diversos antibióticos al alimento o al agua de bebida, con fines terapéuticos y profilácticos, (3)

Respecto al uso de estos, cabe destacar que, dado el incremento en el interés por controlar la resistencia antimicrobiana, comienzan a existir restricciones en el empleo profiláctico de antibióticos. (2,3)

La resistencia a los antibióticos particularmente es una problemática a nivel mundial y la importancia de su estudio es tanto por las fallas terapéuticas en animales, como por el impacto que representa en la salud pública. Por ello, actualmente existe un significativo interés por conocer los niveles de resistencia, efectuar un control cuidadoso y entender cuáles son los factores que influyen en ellos. Un uso excesivo o inadecuado de los antibióticos puede conducir al desarrollo de organismos resistentes a la acción de estos fármacos tanto en bacterias de la microbiota y cepas patógenas, tal y como se ha podido observar en el transcurso de las últimas décadas. (4,5)

Estudiar la susceptibilidad a través de su concentración mínima inhibitoria (MIC por sus siglas en inglés), permite estimar la eficacia “*in vivo*” de un antibiótico. Cuando las concentraciones que puede alcanzar un antimicrobiano en el organismo no superan la MIC, las bacterias tienen la posibilidad de sobrevivir y dar lugar a una resistencia adquirida; ya que el antibacteriano actúa seleccionando entre un microorganismo resistente y uno susceptible. (4, 6)

Colistina

La colistina es un polipéptido catiónico perteneciente a la familia de las polimixinas producida por la bacteria *Paenibacillus polymyxa* var *colistinus*, cuyo mecanismo de acción está basado en la lisis de membrana externa al modificar el lipopolisacárido (LPS) en bacilos Gram negativos por las propiedades tenso activas que le confiere su estructura química, así mediante interacción electrostática con el LPS causando la interrupción de la membrana celular externa que resulta en un aumento de la permeabilidad de la envoltura celular, modifica la estructura de la pared,

lo que permite el acceso del fármaco y en consecuencia su destrucción. (7,8). Pese a que este antibiótico se ha usado desde 1960 para el tratamiento de infecciones ocasionadas por bacterias Gram negativas, su uso declinó significativamente después de la introducción de antibióticos con menor toxicidad, tales como cefalosporinas y los carbapems. (9,10)

Dado que la industria farmacéutica no ha generado nuevas sustancias antibacterianas y el rápido desarrollo de multi-resistencia en bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* a otras familias de antibióticos actuales, se ha renovado recientemente el interés en la colistina para el tratamiento de infecciones por Gram negativos en muchos países, por lo cual, actualmente la colistina está clasificada entre los Antimicrobianos Críticamente Importantes de Alta Prioridad para la medicina humana por la OMS, y se considera el último recurso antimicrobiano para el tratamiento de infecciones por bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas en humanos, en 2014 se incluyó en el panel antimicrobiano obligatorio de vigilancia europea de las *Enterobacteriaceae* de origen animal. (8,11–15)

Debido al aumento en el uso de la colistina se ha evidenciado la emergencia de resistencia, cuyo mecanismo es principalmente cromosómico, sin embargo, ya se ha descrito la resistencia a colistina codificada en plásmidos. (7) Debido a su uso en la ganadería se ha visto que el gen móvil de resistencia a la colistina (*mcr*) está presente en mayor proporción en cerdos en comparación con otras producciones animales. (11)

2 MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamientos de *E. coli*

Se recuperaron aislamientos de *E. coli*, resguardados en el cepario del Laboratorio de Diagnóstico del Departamento de Medicina Veterinaria y Zootecnia de Cerdos de la UNAM. Dichos aislamientos fueron obtenidos del estómago de animales enfermos con diagnóstico presuntivo de colibacilosis.

A los aislamientos identificados como *E. coli* se les realizó la prueba de sensibilidad antimicrobiana a sulfato de colistina por el método de microdilución en caldo para obtener la MIC, conforme a las recomendaciones del CLSI-EUCAST y a la norma ISO 20776-1, usando como cepa control la *E. coli* ATCC 25922. Empleando placas de poliestireno de 96 pozos y con fondo en “U”, que tuvieron la distribución mostrada en la Figura 1.

Figura 1 Distribución de las placas de trabajo

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		Concentración (µg/ml)										Control	
		128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	+	-
Aislamiento	A												
	B												
	C												
	D												
	E												
	F												
	G												
	H												

Preparación del inóculo

Una vez identificados se procedió a sembrar cada uno de los aislamientos en Agar Tripticosa Soya (TSA) para la preparación del inóculo por el método de cultivo líquido, el cual consistió en tomar 5 colonias de la placa de cultivo puro de 18 h de incubación y sembrarlas en 5 mL de caldo tripticosa soya, incubadas a 37 °C durante 2 a 3 h hasta conseguir una turbidez del 0.5 de la escala de MacFarland. (16)

Posteriormente, se hizo una dilución 1:100 en caldo Müeller-Hinton para obtener un inóculo final de 5×10^5 UFC/mL. El inóculo se agregó dentro de los primeros 15 minutos a su ajuste como se recomienda. (16) Se corroboró la concentración del inóculo mediante la dilución de 10 µL de los aislados en 9.9 mL de solución salina, de la cual se sembraron 100 µL en TSA para la comprobación de la concentración, así como pureza y viabilidad del cultivo.

Preparación del antibiótico

Tomando en cuenta los datos de potencia del polvo, pureza (HPLC) y cantidad de agua, proporcionados por el fabricante Sigma-Aldrich para el producto Colistin sulfate salt, Polymyxin E European Pharmacopeia (EP) Reference Standard, Y0000277, se utilizó la fórmula siguiente para obtener la cantidad de antimicrobiano para el volumen de diluyente necesario para la solución de trabajo:

$$\text{Volumen requerido (mL)} = \frac{\text{Antimicrobiano (mg)} \times \text{Potencia (µg/mg)}}{\text{Concentración requerida (µg/mL)}}$$

Se preparó una solución madre de sulfato de colistina en agua estéril quedando a una concentración de 256 µg/mL.

Microdilución en caldo

1. Se colocaron 50 μL de caldo Müeller-Hinton en los 96 pozos de la placa.
2. En la primera fila de la placa se depositaron 50 μL de solución madre de sulfato de colistina. A partir de ésta se realizaron diluciones dobles hasta la fila 10. Así se partió de una concentración de 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
3. La fila 11 se utilizó para el control positivo, caldo de cultivo e inóculo bacteriano, para un volumen final de 100 μL .
4. La fila 12 con el control del antibiótico, medio de cultivo y antibiótico para un volumen final de 100 μL .
5. Se colocaron 50 μL de la fila 1 a la 10 del inóculo bacteriano, usando una pipeta multicanal.
6. Después de la inoculación se le colocó la tapa.
7. Se incubaron a 37 °C durante 18 a 20 h.

Lectura de Resultados

Para determinar el punto final, las placas se colocaron sobre un lector con espejo, en el que se refleja la parte inferior de la placa. La MIC se registró como el valor de la última dilución que inhibió completamente el desarrollo bacteriano, para corroborar esto se sembró en TSA la última dilución en la que se observó turbidez o crecimiento al fondo del pocillo y la siguiente que no tuvo crecimiento para evidenciar que fuera sensible a la dilución observada. El procedimiento se realizó por duplicado.

Para la interpretación de resultados se consideró el número de aislamientos recuperados por año y se analizó la información con una prueba estadística de χ^2 que se ajustó al número de muestras.

Análisis estadístico

Los datos fueron procesados con Microsoft Excel 2010, para ser organizados por año y estado al que pertenecen los aislados. Posteriormente, se realizó la prueba de χ^2 y la prueba exacta de Fisher con el programa JMP para evaluar estadísticamente el efecto del tiempo sobre las proporciones de resistencia. Los resultados de la diferencia con valor $p < 0.05$ se consideraron significativos.

3 RESULTADOS

Fueron recuperados un total de 316 aislados de *E. coli* provenientes de cerdos enfermos, los cuales fueron remitidos durante los años 2003 al 2018 al Laboratorio de diagnóstico del DMZC en la FMVZ-UNAM. A los 316 se les realizó la MIC, sin embargo, para el análisis solo se consideraron aquellas muestras con información del año de aislamiento, quedando un total de 302 aislados. Los valores obtenidos de la MIC por año se muestran en el Cuadro 1. Se puede apreciar el número de

aislamientos por dilución obtenidos para el periodo del 2003 al 2018. Obteniéndose una MIC50 de 2 µg/mL y MIC90 128 µg/mL.

Cuadro 1 Distribución de la MIC por año de aislamiento

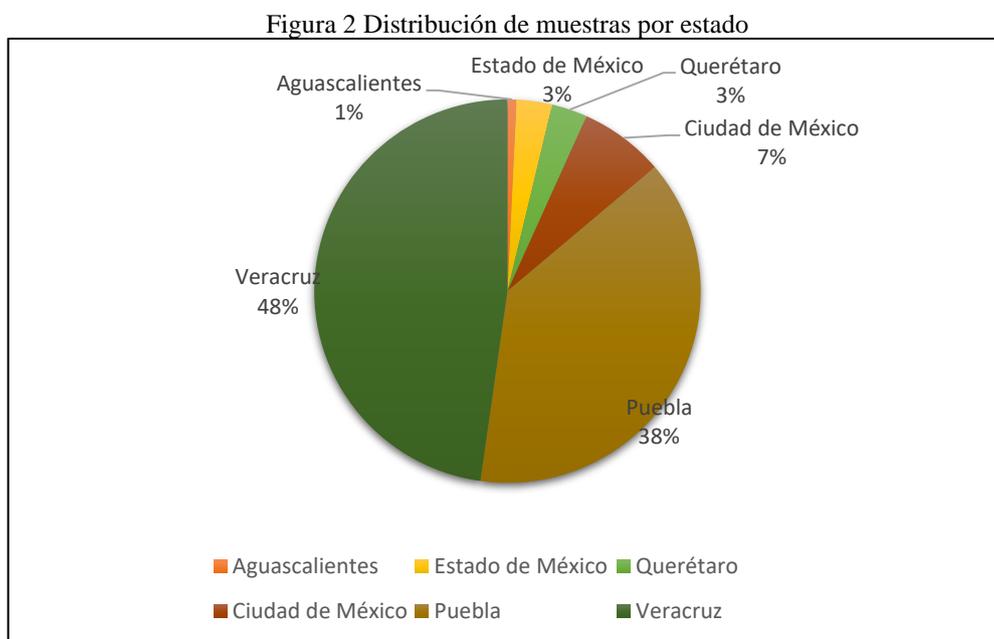
Año	Distribución de la Concentración de Colistina (m/L)										No de <i>E. coli</i> totales/ año
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	
2003	4			1	3	1			1		10
2004		3									3
2005			1								1
2006	1	1			1	1	1	1		1	7
2007		1	1	3	4			1			10
2008	3		2	2	12	2				4	25
2009	2	2	4	1	4	1		1		1	16
2010	9	7	4	1		1	1	1		4	28
2011	7	2	2	3	7	6	1	1	2	7	38
2012	2	5	7	22	5	3	2			4	50
2013	11	3	3	5	1	1		3		11	38
2014	2		1	2	1		1			3	10
2015	4	3	3								10
2016	2	4	3	8	5	1		1			24
2017		1	1	1			1	1			5
2018		2	5	5	12	1			1	1	27
Sin año	7	1	1	2	1					2	14
No. de <i>E. coli</i> totales/dilución	54	35	38	56	56	19	7	9	4	38	316

Una vez obtenidos los valores cuantitativos de la MIC para los 302 aislados, se convirtieron a valores cualitativos (sensible/resistente) utilizando el punto de corte proporcionado por el CLSI/EUCAST para colistina (susceptible 2, resistente >2 µg/mL), la resistencia para el total de aislamientos de *E. coli* de México durante 2003 al 2018 fue de 43.04 % (130/302). En el Cuadro 2 se puede observar la frecuencia de resistencia obtenida por año.

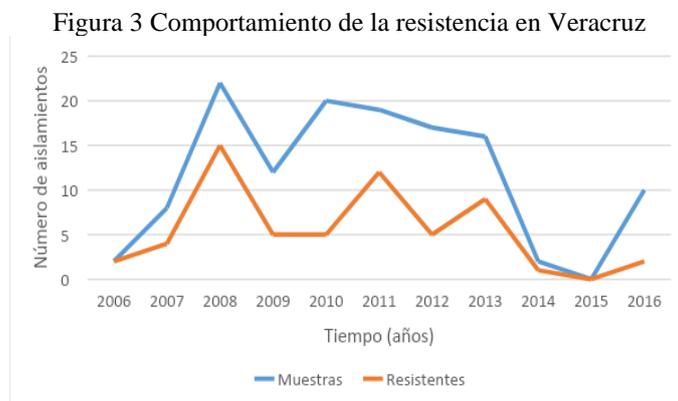
Cuadro 2 Resistencia obtenida por año

NÚMERO DE MUESTRAS RESISTENTES POR AÑO		
AÑO	Muestras	Resistentes
2003	10	5
2004	3	0
2005	1	0
2006	7	5
2007	10	5
2008	25	18
2009	16	7
2010	28	7
2011	38	24
2012	50	14
2013	38	16
2014	10	5
2015	10	0
2016	24	7
2017	5	2
2018	27	15
SIN AÑO	14	3
TOTAL	316	133

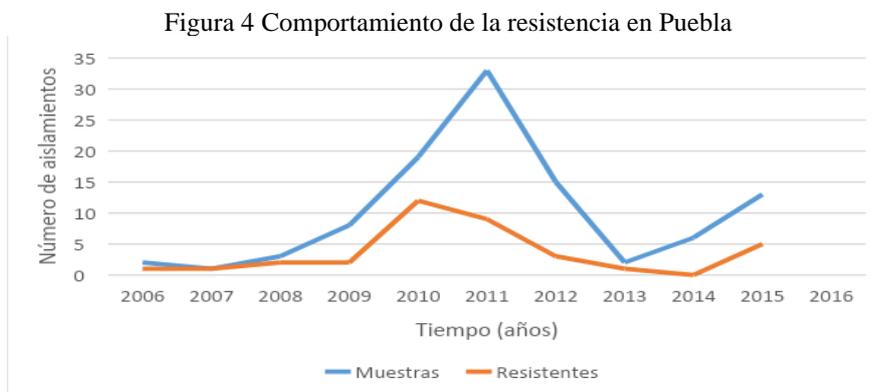
A partir de los registros e historias clínicas se obtuvo información de la procedencia (Figura 2) de las muestras, siendo Veracruz (48 %) el estado que más casos remitió al DMZC, seguido de Puebla (38 %), Ciudad de México (7 %), Estado de México (3) y Querétaro (3 %) y Aguascalientes (1 %).



Los aislamientos de *E. coli* provenientes de Puebla y Veracruz, dos de los principales estados productores de carne de cerdo, tienen un porcentaje de resistencia a la colistina de 35.92 % y 46.87 %, respectivamente, una MIC50 de 2 µg/mL, sin embargo, en la MIC90 difieren con 6 µg/mL para Puebla y 128 µg/mL, para Veracruz. (Cuadro 3) El comportamiento de la resistencia en Veracruz (Figura 3) tiene más variación de la frecuencia de resistencia, ya que se observan durante 2008, 2011 y 2013 aumentos tras años de mayor sensibilidad.



En el estado de Puebla (Figura 4) se observó un aumento a la resistencia en 2010 y posteriormente la sensibilidad se ve aumentada hasta el periodo de 2014-2015 que se puede apreciar un aumento en la resistencia.



Los estados del centro del país mostraron una MIC50 y MIC90 en un intervalo reducido, sin embargo, mostraron una MIC90 dentro del intervalo de resistencia, aunque fueron estados con un número reducido de observaciones. (Cuadro 3)

Cuadro 3 Resistencia por estado

Estado	Resistencia	MIC50	MIC90
	%	µg/mL	µg/mL
Veracruz	46.87	2	128
Puebla	35.92	2	16
Ciudad de México	57.89	4	8
Estado de México	50	2	4
Querétaro	37.5	1	16

Con la finalidad obtener las frecuencias de resistencia a la colistina y evaluar el comportamiento de este antimicrobiano a través de los años en *E. coli*, se realizó el análisis de χ^2 , debido a que el número de muestras obtenidas en los primeros 4 años no era representativo y no se consideraron para este análisis. Los datos obtenidos con los 281 aislamientos restantes se agruparon de manera bienal. La diferencia observada fue de $p=0.003$ para el conjunto de períodos analizados. Los valores de resistencia, MIC50, MIC 90 y distribución de los aislados por periodo se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4 Análisis bienal. Resumen de resultados

	Periodo 1	Periodo 2	Periodo 3	Periodo 4	Periodo 5	Periodo 6
	2007-2008	2009-2010	2011-2012	2013-2014	2015-2016	2017-2018
Muestras (n)	35	44	88	48	34	32
MIC 50 ($\mu\text{g/mL}$)	4	1	2	2	1	4
MIC 90 ($\mu\text{g/mL}$)	128	128	128	128	4	8
% Resistencia	65.71	31.82	43.18	43.75	20.59	53.13

Posteriormente, se compararon los resultados entre los años de cada bienio para conocer las diferencias entre sí, con la finalidad de validar que, pese a que el número de muestras varía entre periodos, se puede realizar el comparativo entre ellos y así validar el efecto del tiempo sobre la prevalencia de resistencia.

Cuadro 5 Comparación estadística entre periodos

	2007-2008	2009-2010	2011-2012	2013-2014	2015-2016
Periodo	1	2	3	4	5
2	P= 0.0027				
3	P= 0.0241	P= 0.2078			
4	P= 0.0477	P= 0.239	P= 0.9491		
5	P= 0.0002	P= 0.2675	P= 0.0204	P= 0.0293	
6	P= 0.2940	P= 0.062	P= 0.3337	P= 0.4107	P= 0.006

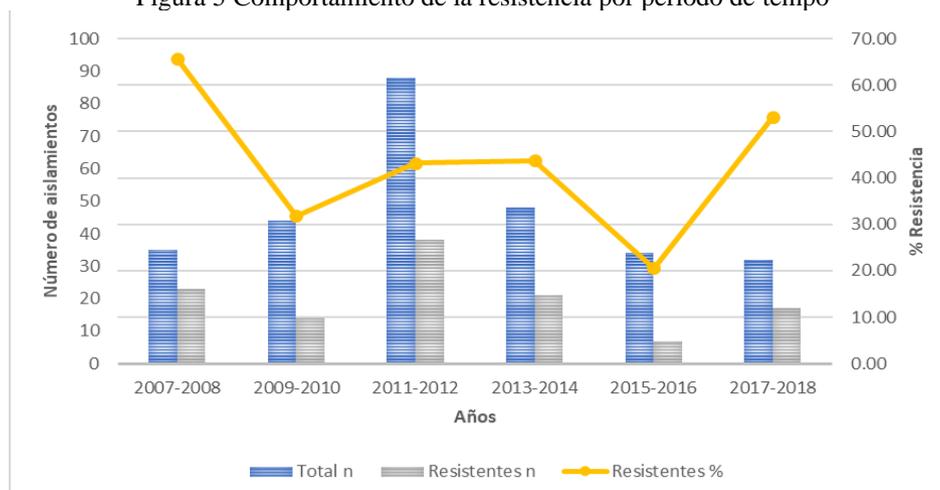
En la evaluación del comportamiento de la resistencia (Cuadro 4) observado a lo largo de la década, las proporciones de resistencia fueron mayores para los años 2007-2008 (65.71 %) y 2017-2018 (53.13 %).

Se observó que los valores de resistencia en los periodos 2, 3 y 4 (2009-2014) fueron similares y no mostraron una diferencia significativa (Cuadro 5), a pesar de la variación del número de muestras. Sin embargo, ocurre lo contrario con el periodo 5, dado que la frecuencia de resistencia disminuyó poco más de la mitad en estos años.

En el periodo 6 correspondiente a los años 2017-2018, hubo un aumento considerable de resistencia respecto al periodo anterior lo que se ve reflejado en el valor de $p= 0.006$, lo cual nos indica que hay una diferencia significativa entre estos dos periodos, siendo resistentes en los 6 bienios.

La MIC50 para los períodos 2 y 5 están dentro del intervalo de sensibilidad, para los otros cuatro períodos, la MIC50 es mayor a $2 \mu\text{g/mL}$ y se consideran resistentes. Para la MIC90, los 6 períodos están dentro del rango de resistencia con valores de $128 \mu\text{g/mL}$ y los dos últimos de 4 y $8 \mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Figura 5 Comportamiento de la resistencia por periodo de tiempo



4 DISCUSIÓN

Se ha descrito que los antibióticos con más resistencia en la producción porcina son las tetraciclinas, sulfas y ampicilina, mientras que en el caso de la colistina es baja en comparación con otros antimicrobianos (17-19), sin embargo, en los resultados obtenidos en este trabajo para *E. coli* la resistencia fue de 43.04 %, con una MIC50 de 2 µg/mL y una MIC90 de 128 µg/mL, por lo que el nivel de resistencia en México es mayor a lo reportado en otros países que tienen sistemas de vigilancia y generan reportes, pero tienen un comportamiento similar a trabajos en los cuales se analizan aislamientos provenientes de animales enfermos y de granjas intensivas.

Delannoy (2017) en Francia, reportó que la resistencia a la colistina en aislamientos de *E. coli* obtenidos en el periodo comprendido entre 2009 y 2013 en cerdos enfermos fue del 100 %, obtuvieron en estos aislados MIC50 y MIC90 de 16 µg/mL, (20) en este estudio los niveles obtenidos de MIC50 fueron de 1 µg/mL (2009) y 2 µg/mL (2013), la resistencia observada en estos periodos también fue menor, sin embargo, en México la MIC90 fue 128 µg/mL, por lo que los aislamientos están más comprometidos.

Algunos países miembros de la Unión Europea en 2013 han reportado muy bajos porcentajes de resistencia a la colistina, tales como Portugal (2.5 %), Lituania (2.2 %), España (2 %), Austria, Dinamarca, Italia y Reino Unido (0.6 %) y Rumania (0.5%), mientras que los demás países miembros tienen 100 % de sensibilidad a este antimicrobiano (21). En México el nivel de resistencia (43 %) obtenido para el 2013 estaba por encima de lo reportado por la Unión Europea.

Para 2017, Austria e Italia mantuvieron su nivel de resistencia (0.6 %), mientras que países como Lituania, Portugal y España reportaron una mayor sensibilidad (1 %, 2.1 % y 0.6 %, respectivamente), sin embargo, Alemania (0.4 %), Grecia (0.6 %), Hungría (1.8 %) y Rumania (1.2 %) reportaron una mayor resistencia con respecto al 2013, (22) lo reportado por estos países representa una gran diferencia de lo encontrado en este trabajo, en el cual el nivel de resistencia en

el periodo 6 (2017-2018) fue de 53.13 %, además, de ser uno de los periodos en donde hubo mayor resistencia en México.

Existen publicaciones de países de la Unión Europea, que permiten tener un panorama del comportamiento de la resistencia a través del tiempo y del tipo de animal (clínicamente sano o enfermo). Así, en Reino Unido, Enne, V. reportó una resistencia del 34.1 %, lo que es ligeramente menor a lo encontrado en este estudio en el estado de Puebla, dicho autor menciona que la prevalencia de resistencia antimicrobiana varía dependiendo de factores como el tipo de animal y la exposición a los antibióticos (19).

Habrun, en un estudio realizado en Croacia, obtuvo un 3 % de resistencia a la colistina de muestras aisladas entre 2009 y 2011, con una MIC50 y MIC90 de 0.094 µg/mL y 0.125 µg/mL, respectivamente. Estos aislamientos fueron considerablemente más sensibles a lo encontrado para este periodo en el presente trabajo, donde se observó un 46 % de resistencia, MIC50 y MIC90 de 2 µg/mL y 128 µg/mL, respectivamente.(17) En ambos estudios, los aislamientos fueron a partir de cerdos con signos clínicos, sin embargo, ellos mencionan que el nivel de resistencia a la colistina fue bajo debido a que era un antibiótico de recién introducción en el país (2 a 3 años previos a la realización de su investigación), a diferencia de que en México, se ha utilizado este antibiótico desde su introducción.

En España, García en el período del 2006 al 2016 reportó una resistencia de 76.9 % a la colistina en aislamientos de *E. coli* obtenidos a partir de cerdos en producción intensiva con signos clínicos; mientras que, en el presente trabajo, los resultados obtenidos en un periodo de tiempo similar y de animales bajo un sistema intensivo de producción se obtuvo un nivel de resistencia menor (43 %), así como en Puebla y Veracruz, estados más productivos del país (36 y 47 %, respectivamente). Un trabajo previo con aislamientos de 1997-1999, encontró una resistencia a la colistina de 26 %, además del posible efecto del tiempo en el incremento de la resistencia en España, están el factor de la intensificación de las granjas y el uso de antimicrobianos como determinantes de la presencia de resistencia. (18,23)

Existen diversos trabajos en donde se realizó la evaluación de la resistencia en China, Liming Lu en un estudio realizado en 2009, detectó una resistencia de 33.3 % en aislamientos, dato similar a lo reportado en este estudio en el mismo período. (24) Yi-Yun Liu encontró una resistencia del 20.9 % en aislamientos realizados de 2011 a 2014, mientras que Zhang en el periodo del 2013-2014 reportó una resistencia de 26.5 %. (25,34) En ambos estudios, los resultados son menores a lo encontrado en el presente trabajo (43 %) para ese mismo periodo de tiempo analizado.

En este trabajo, en el quinto período (2015-2016) se observó el 21 % de resistencia, en las etapas de maternidad y destete, mientras que, en China Zhang reportó que el porcentaje de

resistencia fue 19.2 % para maternidad y 40.7 % en destete. Cabe señalar que China es el país que más consume colistina para la producción porcina y reportan el uso de este antibiótico en todas las etapas, al realizar un seguimiento del efecto de la presión selectiva que ejerce el uso de antibióticos, el porcentaje de resistencia fue mayor en cerdos de engorda de muestras y de 85 % en cerdos adultos. (25)

En aislamientos de 1999 obtenidos en Japón había un 0.8 % de resistencia en *E. coli*, posteriormente, Kazuki y colaboradores reportaron para aislamientos recuperados entre 2001 y 2004, un 35.6 % de resistencia, por lo que concluyeron que estos niveles se ven influenciados por las tendencias de consumo de antibióticos y que en animales enfermos es mayor la resistencia en comparación con aislamientos provenientes de animales sanos, como se ha mencionado en otros países. (26)

Este trabajo describe la presencia de resistencia a la colistina en aislamientos de cerdos enfermos que estuvieron en granjas de producción intensiva. La colistina es el tratamiento de elección para la colibacilosis y la diarrea post destete (27), por lo cual es muy probable que los animales estuvieran previamente expuestos a este antibiótico, aunado a que no existe reporte de medicación previa en las historias clínicas. Sin embargo, la OIE ha elaborado tres versiones del Informe de los agentes microbianos utilizados en animales (28–31) lo cual nos da un panorama general del consumo de polipéptidos, grupo de antibióticos al que pertenece la colistina, en la región de las Américas. Este comportamiento es similar a los valores de resistencia mostrados en este trabajo, lo cual podría explicar porque al aumentar el consumo durante un periodo de tiempo, la resistencia aumenta y al disminuir la exposición a este antibiótico, los aislados mostraron mayor sensibilidad. Aunado a lo anterior, Villoldo en 2019 estudió la correlación entre la cantidad de fármaco consumida y el nivel de resistencia, encontrando en estas dos variables una tendencia similar, reafirmando así el que la resistencia a la colistina puede estar ligada al uso de este antibiótico, ya que la resistencia disminuyó cuando disminuyeron las ventas totales de colistina. (32)

Se ha comentado anteriormente el impacto que tiene el tipo de animal muestreado sobre los niveles de resistencia, las tendencias de consumo de los antibióticos y el grado de intensificación de las granjas de donde provienen los aislamientos. De igual forma, la literatura ofrece un panorama de la variación de resistencia entre las diversas poblaciones de un país, dado que no todos los animales están bajo las mismas condiciones. En este trabajo se pudieron analizar los comportamientos de diferentes estados de la República Mexicana. Puebla y Veracruz fueron los que más muestras remitieron al laboratorio en el periodo de respectivamente). En cuanto a los resultados obtenidos de la MIC₉₀ (16 µg/mL para Puebla y 128 µg/mL en Veracruz), indican graves problemas

de resistencia en ambos estados. En los aislamientos de estados pertenecientes a la zona centro del país, se obtuvieron resultados para la MIC₉₀ de 4 µg/mL para el Estado de México, 8 µg/mL para la Ciudad de México y 16 µg/mL para Querétaro, que también provenían de animales enfermos y de producciones intensivas, considerados como resistentes, sin embargo, es menor a los estados más productores de cerdo. Además, la MIC₅₀ obtenida en los aislamientos ya se encuentra en el punto de corte (2 µg/mL) esta es una de las razones por la cual la preocupación de la aparición de resistencia en medicina veterinaria y sobre todo en animales productores de alimento va en aumento.

La administración de colistina en cerdos es más común en alimentos y agua, por lo que animales enfermos y sanos son expuestos al antibiótico, (3) lo que aumenta el riesgo de seleccionar bacterias resistentes. Para este trabajo el comportamiento de la resistencia no puede relacionarse directamente a una previa exposición a la colistina dado que no se cuenta con información del manejo en el que se encontraban los animales de los cuales provenían las muestras. Para el monitoreo a futuro de la resistencia, es necesario que tanto las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana como la dosificación en cerdos de los antimicrobianos sean estandarizados, para que bajo estas condiciones permita la comparación de eficacia terapéutica y frecuencia de resistencia entre estudios.

Los resultados obtenidos en este trabajo fueron determinados a través de la MIC, mediante la prueba de microdilución en caldo, para conocer la frecuencia del gen *mcr* y sus variantes que han estado presentes en la producción porcina de México es necesario realizar pruebas moleculares. Ya que, Garza en 2018 reporta la detección del gen *mcr-1* proveniente de una *E. coli* aislada en 2015 de un cerdo sano de dos meses de edad, pudiendo haber sido expuesto a colistina en las primeras semanas de vida. (33)

La aparición de la RAM no solo es responsabilidad de la salud animal, es consecuencia del mal uso que han dado a los antibióticos en medicina humana, como lo es su uso en el tratamiento de enfermedades virales, las aguas residuales y su uso para el riego de productos agrícolas. Estas prácticas de igual forma representan factores de riesgo para la diseminación de microorganismos resistentes.

5 CONCLUSIÓN

De un total de 316 aislamientos analizados de *E. coli* provenientes de cerdos enfermos, el porcentaje de resistencia a la colistina fue de 43 % en el período de 2003 a 2018. Veracruz y Puebla fueron los Estados con el mayor número de muestras analizadas. La MIC₅₀ está comprometida ya que cuatro de los seis períodos están por arriba del punto de corte y la MIC₉₀ con valores altos de resistencia en todos los períodos. Al realizar el análisis para conocer el comportamiento de esta

resistencia a lo largo de la década, se observó diferencia estadísticamente significativa ($p=0.003$). La falta de datos clínicos específicos del uso de colistina en cerdos a partir de los cuales se obtuvieron las muestras no permitió conocer el grado de exposición previa a este antibiótico y su relación con el nivel de resistencia obtenido. Por lo tanto, es necesario establecer monitoreos de la resistencia bacteriana con el fin de evaluar la viabilidad del uso de colistina en las producciones porcinas. Así mismo, es de suma importancia buscar alternativas terapéuticas competitivas para colistina en la industria porcina, para preservar la efectividad de este antibiótico, crucial en medicina humana.

Debido al reciente interés en la colistina y la creciente preocupación de la resistencia antimicrobiana, existe cada vez más información sobre la relación del desarrollo de resistencia con los tratamientos administrados en granjas comerciales, sin embargo, deberán ser evaluados de una forma que los valores sean representativos para la evaluación de las opciones de tratamiento y medidas a tomar.

Será vital para la lucha contra la resistencia a los antimicrobianos, hacer diagnósticos de laboratorio para conocer la incidencia de las enfermedades que afectan al ganado y los niveles de resistencia a los antimicrobianos. Esta vigilancia permitirá tomar medidas correctivas, ya que la principal causa de la resistencia es el uso incorrecto de los antimicrobianos por prescripción innecesaria y fallas en la dosificación.

REFERENCIAS

1. Magallón, Emilio; García, Alberto; Bautista, Roberto; Alonso, Boris; Cano, José Ignacio; Prieto, Patricia; Magallón P. Manejo y gestión de maternidades porcinas II. La lactación. Editorial Servet; 2015. 200 p.
2. Prieto Suárez, Cinta; Martínez Lobo, Francisco Javier; Segalés i Coma, Joaquim; Carvajal Urueña AM. Enfermedades infecciosas del ganado porcino. 2017. 264 p
3. Colibacilosis (E. coli diarrhea) | Iowa State University [Internet]. [Consultado 2020 Abril 4]. Disponible en: <https://vetmed.iastate.edu/vdpam/FSVD/swine/index-diseases/colibacilosis>
4. OMS | Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. [Consultado 2020 Abril 4]. Disponible en: https://www.who.int/topics/antimicrobial_resistance/es/
5. AMR_ES: OIE - World Organisation for Animal Health [Internet]. [Consultado 2020 Abril 4]. Disponible en: <https://www.oie.int/es/para-los-periodistas/amr-es/>
6. OIE. Criterios usados para la clasificación de los agentes antimicrobianos LISTA DE AGENTES ANTIMICROBIANOS. 2015;33(0):1–9.
7. Gao Y, Lu C, Shen D, Liu J, Ma Z, Yang B, et al. Elimination of the risks of colistin resistance gene (*mcr-1*) in livestock manure during composting ☆. *Environ Int* [Internet]. 2019;126(February):61–8. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.02.015>
8. Medina DJ, Paciel D, Noceti O, Rieppi G. Actualización acerca de colistina (polimixina E): aspectos clínicos, PK/PD y equivalencias. 2017;33(3):195–206.
9. Yu Z, Qin W, Lin J, Fang S, Qiu J. Antibacterial mechanisms of polymyxin and bacterial resistance. *Biomed Res Int*. 2015;2015(May)
10. Maalej SM, Meziou MR, Rhimi FM, Hammami A. Comparison of disc diffusion, Etest and agar dilution for susceptibility testing of colistin against Enterobacteriaceae. *Lett Appl Microbiol*. 2011;53(5):546–51..
11. Oteo J, Calbo E, Rodríguez-Baño J, Oliver A, Hornero A, Ruiz-Garbajosa P, et al. La amenaza de las enterobacterias productoras de carbapenemasas ~ documento de posicionamiento de los grupos de estudio en España: GEIH y GEMARA de la SEIMC. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2014 Dec 1 [Consultado 2019 Feb 20];32(10):666–70. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213005X14000809>
12. Rhouma M, Beaudry F, Letellier A. Resistance to colistin: what is the fate for this antibiotic in pig production? *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2016;48(2):119–26. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.04.008>
13. Rhouma M, Beaudry F, Thériault W, Bergeron N, Laurent-Lewandowski S, Fairbrother JM, et al. Gastric stability and oral bioavailability of colistin sulfate in pigs challenged or not with *Escherichia coli* O149:F4 (K88). *Res Vet Sci* [Internet]. 2015;102:173–81. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.08.005>

14. Poirel L, Aurélie J, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes Laurent Poirel,a,b,c, Aurélie Jayola,b,c and Patrice Nordmann. Clin Microbiol Rev. 2017;30(2):557–96.
15. Kempf I, Jouy E, Chauvin C. Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. Int J Antimicrob Agents [Internet]. 2016;48(6):598–606. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.09.016>
16. Rhouma M, Fairbrother JM, Beaudry F, Letellier A. Post weaning diarrhea in pigs : risk factors and non - colistin - based control strategies. Acta Vet Scand. 2017;1–19.
17. ISO 20776-1:2019 Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices — Part 1: Broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases
18. Habrun B, Dragica S, Kompes G, Benić M. Antimicrobial susceptibility of enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from weaned pigs in Croatia. Acta Vet Brno. 2011;61(5–6):585–90.
19. García V, García-Meniño I, Mora A, Flament-Simon SC, Díaz-Jiménez D, Blanco JE, et al. Co-occurrence of mcr-1, mcr-4 and mcr-5 genes in multidrug-resistant ST10 Enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Spain (2006-2017). Int J Antimicrob Agents. 2018;52(1):104–8.
20. Enne VI, Cassar C, Springs K, Woodward MJ, Bennett PM. RESEARCH LETTER A high prevalence of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from pigs and a low prevalence of antimicrobial resistant *E. coli* from cattle and sheep in Great Britain at slaughter. 2007;
21. Delannoy S, Devendec L Le, Jouy E, Fach P, Drider D, Kempf I. Characterization of colistin-resistant *Escherichia coli* isolated from diseased pigs in France. Front Microbiol. 2017;8(NOV):1–12.
22. Food Safety Authority E. SCIENTIFIC REPORT OF EFSA AND ECDC EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013 European Food Safety Authority European Centre for Disease Prevention and Control. EFSA J [Internet]. 2013;1313(17810). Disponible en: www.efsa.europa.eu/efsajournal
23. Food E, Authority S. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018. EFSA J. 2020;18(3).
24. Zhang X, Zhang B, Guo Y, Wang J, Zhao P, Liu J, et al. Colistin resistance prevalence in *Escherichia coli* from domestic animals in intensive breeding farms of Jiangsu Province. Int J Food Microbiol. 2019;291(November 2018):87–90.
25. Communications- S. SHORT COMMUNICATIONS- in enteric porcine *Escherichia coli* strains in Spain. 2000;(1997):703–6.

26. Lu L, Dai L, Wang Y, Wu C, Chen X, Li L, et al. Characterization of antimicrobial resistance and integrons among *Escherichia coli* isolated from animal farms in Eastern China. *Acta Trop*. 2010;113(1):20–5.
27. Harada K, Asai T, Kojima A, Oda C, Ishihara K, Takahashi T. Antimicrobial susceptibility of pathogenic *Escherichia coli* isolated from sick cattle and pigs in Japan. *J Vet Med Sci*. 2005;67(10):999–1003.
28. Callens B, Boyen F, Catry B, Ingenbleek A, Butaye P, Haesebrouck F, et al. Reply to letter to the Editor by Moore and Elborn (2012) concerning the manuscript “ Prophylactic and metaphylactic antimicrobial use in Belgian fattening pig herds” by B. Callens et al. (2012). *Prev Vet Med*. 2012;107(3–4):288–90.
29. World Organisation for Animal Health. OIE Annual report on antimicrobial agents intended for use in animals. Second Report. París, Francia; 2017.
30. World Organisation for Animal Health. OIE Annual report on antimicrobial agents intended for use in animals. 2016. OIE World Organ Anim Heal. 2016;
31. World Organisation for Animal Health. OIE Annual report on antimicrobial agents intended for use in animals. Third Report. 2018.
32. Miguela-Villoldo P, Hernández M, Moreno MA, Rodríguez-Lázaro D, Quesada A, Domínguez L, et al. National colistin sales versus colistin resistance in Spanish pig production. *Res Vet Sci* [Internet]. 2019;123(January):141–3. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.01.010>
33. Garza-Ramos U, Tamayo-Legorreta E, Arellano-Quintanilla DM, Rodriguez-Medina N, Silva-Sanchez J, Catalan-Najera J, et al. Draft genome sequence of a multidrug- and colistin-resistant *mcr-1*- producing *Escherichia coli* isolate from a swine farm in Mexico. *Genome Announc*. 2018;6(10):1–2.
34. Crofts TS, Gasparrini AJ, Dantas G. Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. Vol. 15, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group; 2017. p. 422–34.