



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

**Detección de genes de resistencia antimicrobiana en
aislados de *Escherichia coli* de cerdos de producción
con cuadros diarreicos**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinaria

AUTOR

Diana Carolina ESCALANTE ESTRADA

ASESOR

Juan José SIUCE MORENO

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Escalante D. Detección de genes de resistencia antimicrobiana en aislados de *Escherichia coli* de cerdos de producción con cuadros diarreicos [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2021.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Diana Carolina Escalante Estrada
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	71982690
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-7457-4806
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Juan Jose Siuce Moreno
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	42807429
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-9673-7853
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Sonia Yenny Calle Espinoza
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10321145
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Juan Raúl Lucas López
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	42249664
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Mariella Ramos Gonzalez
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	43068125
Datos de investigación	

Línea de investigación	B.4.1.5. Microbiología y Parasitología Veterinaria
Grupo de investigación	Microbiología Aplicada a la Salud Pública, Animal y de Impacto Ambiental.
Agencia de financiamiento	Perú. Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC). FONDECYT (PROCIENCIA). N° 413-2019-FONDECYT
Ubicación geográfica de la investigación	Lugar: Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, sección Bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: San Borja Latitud: -12.080917 Longitud: -76.987626
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2020-2021
URL de disciplinas OCDE	Biología celular, Microbiología: https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01 Ciencia veterinaria https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS EN MODALIDAD VIRTUAL
PARA OPTAR EL TÍTULO DE MEDICO VETERINARIA
Autorizado por R.D N° 304-D-FMV-2020**

1. FECHA DE LA SUSTENTACIÓN 23/12/2021

HORA INICIO: 10:30 horas

HORA TÉRMINO: 12:00 horas

2. MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTE: **Blga. Mg. Calle Espinoza, Sonia Yenny**

MIEMBRO: **MV. Dr. Lucas López, Juan Raúl**

MIEMBRO: **MV. Dra. Ramos Gonzalez, Mariella**

ASESOR: **MV. Dr. Siuce Moreno, Juan José**

3. DATOS DEL TESISISTA

APELLIDOS Y NOMBRES: **ESCALANTE ESTRADA, DIANA CAROLINA**

CÓDIGO: **13080047**

R.R. DE GRADO DE TESISISTA NÚMERO: **N° 013777-2020-R-UNMSM**

TÍTULO DE LA TESIS: **"DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN AISLADOS DE *Escherichia coli* DE CERDOS DE PRODUCCIÓN CON CUADROS DIARREICOS"**

4. RECOMENDACIONES CUMPLIDAS

1. Se aceptó el cambio del título de la tesis Por: "Detección de genes de resistencia antimicrobiana en aislados de *Escherichia coli* de cerdos de producción con cuadros diarreicos"
2. Se realizaron cambios en el manuscrito, de eliminar la 2da conclusión
Debe decir: "... Se determinó una alta frecuencia de genes de resistencia antimicrobiana..."
3. Se mejoraron las Imágenes

Datos de la plataforma virtual institucional del acto de sustentación:

<https://meet.google.com/tdb-rxtb-mmf>

<https://meet.google.com/bus-qxuq-pdr>

Grabación archivada en: google

5. NOTA OBTENIDA: 15 (Quince)

6. PÚBLICO ASISTENTE: (Nombre, apellido y DNI)

Apellidos y Nombres	DNI	Correo electrónico
Ireijo Mitsuta Pamela	40755314	pamela.ireijo@gmail.com
Salvatierra Luna Moisés	10868267	moisesalvatierraluna@gmail.com
Ponce Dextre Kevin	70095850	kevinscottponcedextre@gmail.com
Estrada Riera Norma	25627096	mia.norma.er@gmail.com

7. FIRMAS DE LOS MIEMBROS DEL JURADO

Firma

Bлга. Mg. Calle Espinoza, Sonia Yenny
Apellidos y Nombres
PRESIDENTE

Firma	Firma	Firma
		
MV. Dr. Siuce Moreno, Juan José	MV. Dr. Lucas López, Juan Raúl	MV. Dra. Ramos Gonzalez, Mariella
Apellidos y Nombres	Apellidos y Nombres	Apellidos y Nombres
ASESORA DE LA TESIS	MIEMBRO JURADO	MIEMBRO JURADO

Dedicatoria y agradecimientos

A mi mamá Norma, quien me enseñó el significado de la perseverancia para salir adelante y lograr mis metas, quien siempre estuvo en cada paso apoyándome.

A mi hermano Luis, por la gran responsabilidad que decidiste asumir con la familia y aun así siempre tener la manera de apoyarme a ser una mejor persona y profesional.

A mis abuelos Enrique y Margarita, espero seguir aprendiendo de ustedes cada día y que sigan guiando mi día a día, tenerlos a mi lado es una bendición.

A mi asesor Juan Siuce y compañeros del laboratorio, quienes me guiaron durante todo el proceso, por sus consejos y paciencia.

Proyecto financiado por CONCYTEC, a través de su unidad ejecutora FONDECYT (PROCIENCIA) contrato N° 413-2019-FONDECYT.

INDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	III
LISTA DE CUADROS	V
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE ANEXOS	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 COMPLEJO ENTÉRICO PORCINO	3
2.1.1 COLIBACILOSIS PORCINA	3
2.1.1.1 COLIBACILOSIS ENTERICA	4
2.1.1.2 ENFERMEDAD DE LOS EDEMAS	5
2.1.1.3 TRATAMIENTO	7
2.1.1.4 PREVENCIÓN	7
2.2 <i>Escherichia coli</i>	8
2.2.1 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS	8
2.2.2 PATOTIPOS Y PATOGENIA	9
2.2.2.1 <i>E. coli</i> ENTEROPATÓGENA (EPEC)	9
2.2.2.2 <i>E. coli</i> ENTEROTOXIGÉNICA (ETEC)	11
2.2.2.3 <i>E. coli</i> PRODUCTORAS DE TOXINA SHIGA (STEC)	12
2.2.2.4 <i>E. coli</i> ENTEROAGREGATIVA (EAEC)	13
2.2.2.5 <i>E. coli</i> ENTEROINVASIVA (EIEC)	14
2.2.2.6 <i>E. coli</i> DE ADHERENCIA DIFUSA (DAEC)	14
2.3 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA	17
2.3.1 GENERALIDADES	17
2.3.2 IMPORTANCIA EN LA SALUD ANIMAL Y PÚBLICA	17
2.3.3 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS PRINCIPALES ANTIBIÓTICOS CONTRA <i>E. coli</i>	19
2.3.3.1 TETRACICLINAS	19

2.3.3.2 BETALACTÁMICOS	20
2.3.3.3 CLORANFENICOL	20
2.3.3.4 TRIMETOPRIM - SULFAMETAXOL	21
2.3.3.5 QUINOLONAS	21
2.3.3.6 AMINOGLUCOSIDOS	22
2.3.4 MECANISMOS DE RESISTENCIA	22
2.3.4.1 MODIFICACION DE LA MOLECULA ANTIBIOTICA	22
2.3.4.2 DISMINUCIÓN DE LA PENETRACIÓN DE ANTIBIOTICOS Y EFLUJO	24
2.3.4.6 CAMBIOS DE MOLÉCULAS DIANA	25
2.3.5 GENÉTICA DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA	28
2.3.6 GENÉTICA DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN <i>E. coli</i>	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS	32
3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN Y PERIODO DE DURACIÓN	32
3.2 MATERIAL EXPERIMENTAL	32
3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL	33
3.3.1 TAMAÑO DE MUESTRA	33
3.3.2 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA	34
3.3.2.1 REACTIVACIÓN DE LOS AISLADOS	34
3.3.2.2 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN	34
3.3.2.3 DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS	34
3.3.2.4 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	37
4. RESULTADOS	38
5. DISCUSIÓN	45
6. CONCLUSIONES	50
7. LITERATURA CITADA	51
8. ANEXOS	61

RESUMEN

La diarrea neonatal y post destete en cerdos son enfermedades con altas tasas de morbilidad y mortalidad, siendo el principal causante la *Escherichia coli*, cuyos protocolos de tratamiento son poco eficaces debido a la resistencia antimicrobiana que por diversos mecanismos genéticos pueden transmitir esta capacidad a otras poblaciones bacterianas. Por ello, el presente estudio tuvo como objetivo la detección de los genes de resistencia antimicrobiana en aislados de *Escherichia coli* de cerdos de producción con diarrea. Se evaluaron 119 aislados de *Escherichia coli* recolectados de cerdos con diarrea, remitidas por veterinarios y productores de granjas porcinas de Lima desde el 2017 hasta el 2020 y enviados al Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, sección Bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Estas cepas fueron reactivadas para la extracción del ADN y posterior detección de genes de resistencia a los principales antibióticos y de mayor importancia en la industria porcina, tales como las tetraciclinas (*tetA*, *tetB* y *tetC*), sulfonamidas (*sul1*, *sul2* y *sul3*), estreptomicina-espectinomicina (*strA/strB*, *aadA*) y apramicina (*aac(3)IV*) mediante la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR). De las 119 cepas, el 98.3% (117/119) fueron positivas a por lo menos un gen de resistencia antimicrobiana, siendo el de mayor frecuencia el grupo de las tetraciclinas (88.2%), seguido de las sulfonamidas (65.5%), estreptomicina-espectinomicina (64.7%), y por último la apramicina (2.5%). De la misma manera, la mayor presencia de resistencia a dos antimicrobianos fueron en las sulfonamidas con las tetraciclinas en un 59.6% (71/119). De los 10 diferentes genes de resistencia antimicrobiana considerados, el gen *tetA* tuvo la frecuencia más alta con 68% (81/119), seguido del gen *sul3* con 64.7% (77/119), seguida del gen *strB* con un 42% (50/119), *aadA* con 39.5% (47/119), *strA* con 34.5% (41/119), *tetB* con 31.9% (38/119), *aac(3)IV* con

2.5% (2/119) y los genes *sul1* y *tetC* ambos con 0.8% (1/119); el gen *sul2* fue negativo en todas las cepas. Del total de cepas procesadas, el 41.2% (49/119) fueron considerados multidrogo-resistentes por mostrar resistencia a más de 3 antibióticos. El elevado porcentaje de genes de resistencia antimicrobiana nos indica una realidad a la problemática de la resistencia bacteriana contra los antimicrobianos, por lo que se debe considerar la gran importancia de la vigilancia de resistencia antimicrobiana y el buen uso de antibióticos en nuestro país.

Palabras claves: *Escherichia coli*; cerdo; resistencia antimicrobiana; genes de resistencia

ABSTRACT

Neonatal and post-weaning diarrhea in pigs are diseases with high rates of morbidity and mortality, the main cause is *Escherichia coli*, treatment protocols are not very effective due to antimicrobial resistance using many genetic mechanisms can transmit this capacity to other bacterial populations. bacterial. Therefore, the present study aimed to detect antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* isolates from production pigs with diarrhea. 119 isolates of *Escherichia coli* were collected from pigs with diarrhea sent by veterinarians and producers of pig farms in Lima from 2017 to 2020, to the Laboratory of Microbiology and Veterinary Parasitology, Bacteriology section of the Faculty of Veterinary Medicine of the University National Mayor of San Marcos. These isolates were reactivated for DNA extraction to perform a Polymerase Chain Reaction (PCR) to detect resistance genes of the most important antibiotics in the swine industry, such as tetracyclines (*tetA*, *tetB* and *tetC*), sulfonamides (*sul1*, *sul2* and *sul3*), Streptomycin-spectinomycin (*strA* / *strB*, *aadA*) and apramycin (*aac(3)IV*) by. 98.3% (117/119) were positive for at least one antimicrobial resistance gene, the most detected was the group of tetracyclines (88.2%), followed by sulfonamides (65.5%), streptomycin - spectinomycin (64.7%), and apramycin (2.5%). In the same way, the greatest presence of resistance to two antimicrobials was in sulfonamides with tetracyclines in 59.6% (71/119). Of the 10 different antimicrobial resistance genes considered, the *tetA* gene had the highest frequency with 68% (81/119), followed by the *sul3* gene with 64.7% (77/119), followed by the *strB* gene with 42% (50 /119), *aadA* with 39.5% (47/119), *strA* with 34.5% (41/119), *tetB* with 31.9% (38/119), *aac(3)IV* with 2.5% (2/119), and the genes *sul1* and *tetC* both with 0.8% (1/119); the *sul2* gene was negative in all strains. Of the total strains processed, 41.2% (49/119) were considered multidrug-resistant for showing resistance to more than 3 antibiotics. The high percentage of antimicrobial resistance genes indicates a reality to the problem of bacterial

resistance against antimicrobials, so the great importance of antimicrobial resistance surveillance and the proper use of antibiotics in our country should be considered.

Key words: *Escherichia coli*; pig; antimicrobial resistance; resistance genes

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Cebadores utilizados para la detección de resistencia a antibióticos.

Cuadro 2. Frecuencia de resistencia antimicrobiana a los diferentes grupos de antibióticos.

Cuadro 3. Frecuencia en la resistencia antimicrobiana a más de dos antibióticos.

Cuadro 4. Frecuencia de genes de resistencia antimicrobiana.

Cuadro 5. Frecuencia a dos genes de resistencia antimicrobiana.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de patogenia de *E. coli* diarreogénicas.

Figura 2. Representación de diferentes tipos de enzimas modificadoras de aminoglucósidos y sus sustratos.

Figura 3. Sistema de eflujo de antibióticos.

Figura 4. Mecanismo de resistencia a las quinolonas.

Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la ampliación del gen *tetA* (502 pb), *tetB* (930 pb) y *tetC* (888 pb).

Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la ampliación del gen *strA* (546 pb) y *strB* (509 pb).

Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la ampliación del gen *Sul3* (880pb), *aaC(3)IV* (653 pb) y *sulI* (779 pb).

Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la ampliación del gen *addA* (525pb).

Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la ampliación del gen *Sul2* (721pb).

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Protocolo de purificación de ADN Genómico de bacterias Gram negativas.

ANEXO 2. Lista de cepas positivas y negativas a genes de resistencia antimicrobiana.

ANEXO 3 Lista de cepas con su lugar de procedencia.

1. INTRODUCCIÓN

El uso indiscriminado de antimicrobianos en la producción animal, no solo como base terapéutica, sino también como aditivo alimentario considerado como promotor de crecimiento, han provocado el incremento de resistencia antimicrobiana no solo en bacterias patógenas, pues la resistencia puede también ser transmitida entre cepas no patógenas (Van den Bogaard y Stobberingh, 2000) incluso de diferentes especies bacterianas, a través de la transferencia horizontal de genes, convirtiéndose en un tema de gran importancia en los últimos años, por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) establece estrategias para el buen manejo de los antimicrobianos y la vigilancia de resistencia antimicrobiana, sobre todo en animales destinados al consumo, a través de métodos fenotípicos y moleculares (pruebas genéticas), como el PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) (OMS, 2001), que está siendo utilizado en diversos países para detectar genes de resistencia antimicrobiana en animales de producción (Boerlin *et al.*, 2005; Brand *et al.*, 2017; Mazurek *et al.*, 2018).

La *Escherichia coli* (*E. coli*), se encuentra distribuida a nivel mundial no solo por ser un agente patógeno causando diarreas y enfermedades extraintestinales, pues también es parte de la microbiota normal de personas y animales, siendo el principal causante de diarreas en cerdos, provocando grandes pérdidas económicas (Luppi 2017), llevando al uso indiscriminado de antimicrobianos tanto de manera terapéutica así como aditivo alimentario, lo que llevó a una alta resistencia antimicrobiana en esta especie a comparación del ganado vacuno, incluso en animales aparentemente sanos (Lim *et al.*, 2007), siendo un riesgo en la salud pública la transmisión de éstos patógenos alimentos, consumo de carnes poco cocidas y contaminación cruzada (Sheikh *et al.*, 2012).

A pesar de los esfuerzos por parte de la OMS y el SENASA para controlar el uso de antimicrobianos de manera indiscriminada, en nuestro país se han realizados estudios que demuestran la presencia de resistencia antimicrobiana en cepas de *E. coli* (Saldarriaga *et al.*

2000; Monterroso *et al.*, 2019) en animales de producción, siendo en su mayoría mediante el uso de estudios fenotípicos , por lo que es importante la implementación de métodos de vigilancia de resistencia antimicrobiana y el conocimiento de la situación de ésta en nuestro medio, y así considerar la importancia de la vigilancia de resistencia antimicrobiana y el buen uso de antibióticos en nuestro país.

El objetivo del estudio fue determinar la frecuencia de genes de resistencia antimicrobiana en aislados de *Escherichia coli* en cerdos con cuadros diarreicos mediante PCR convencional.

2. ANTECEDENTES

2.1 COMPLEJO ENTÉRICO PORCINO

Las enfermedades entéricas son de gran importancia en la producción porcina, ya que causa grandes pérdidas económicas por el aumento en los gastos en antimicrobianos, retraso de crecimiento de lechones, muerte antes del destete, mala conversión alimenticia, entre otros; donde los animales tienen como signo principal las diarreas (Quiles y Hevia, 2008). Estas pérdidas se vieron reflejadas en el brote de colibacilosis de una granja porcina en el distrito de Carabayllo en 1996, reportándose pérdidas económicas por muertes de lechones y gastos en medicamentos que alcanzaron hasta un 25% del total de gastos (Rodríguez, 2014).

Este proceso entérico es causado por diversos agentes etiológicos que pueden actuar de forma individual o en conjunto, siendo este último más frecuente, por lo que es conocido como un complejo entérico causado por la interacción de distintos patógenos, tales como: agentes virales (Circovirus porcino tipo 2 (PCV-2), Coronavirus, Rotavirus), parásitos (*Trichuris suis*, *Ascaris suum*) y bacterias (*Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli*, *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*) (Perfumo *et al.*, 2019).

2.1.1 COLIBACILOSIS PORCINA

Causada por la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*), la cual está presente en el tracto digestivo de humanos y animales como comensal o saprófita. Sin embargo, también es la responsable de diversos síndromes principalmente en lechones, tales como: diarrea neonatal, diarrea post destete y enfermedad de los edemas (López-Álvarez, 2010); causando altas tasas de morbilidad, disminución en la producción, costos en tratamiento y mortalidad, siendo esta una de las enfermedades más importantes en la industria porcina (Luppi, 2017; Zimmerman *et al.*, 2019).

La colibacilosis es considerada una enfermedad multifactorial, por lo que es causada por varios factores desencadenantes, siendo el destete el más importante, causando cuadros de diarrea y aumento en la predisposición de infecciones secundarias originando la mortalidad en las granjas porcinas. La patogenicidad de la *E. coli* se basa en la presencia de factores de virulencia que son los responsables de la aparición de enfermedad en humanos y animales (Zimmerman *et al.*, 2019). *E. coli* es eliminada por las heces, aumentando el riesgo de brotes de Colibacilosis en granjas con hacinamiento animal, malas instalaciones, poca higiene y mal manejo (Lazo *et al.*, 2009; Turcás *et al.*, 2012).

2.1.1.1 COLIBACILOSIS ENTERICA

- **SIGNOS CLÍNICOS**

La presentación de signos clínicos causados por *E. coli* depende de varios factores, tales como la inmunización de la madre y niveles de anticuerpos en el lechón obtenidos por medio del calostro, edad al destete, condiciones sanitarias. proporción de proteínas en el pienso, entre otros (Malik *et al.*, 2012).

La colibacilosis porcina se caracteriza por la presencia de diarreas; estas pueden ser evidenciables principalmente en neonatos, que son producidas generalmente por la *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) reportándose principalmente desde el día 0 al 4 de nacimiento debido a una contaminación del lechón después del parto o baja inmunidad del lechón, presentando diarreas acuosas de color amarillo o blancas, alcanzando una mortalidad de hasta el 70% de las camadas afectadas (Lupi, 2017). Las diarreas post destete son causadas principalmente por ETEC y *E. coli* enteropatogénica (EPEC) debido al cese de ingesta de leche materna, poca inmunidad del lechón y el estrés de un destete prematuro (Rhouma *et al.*, 2017), son cuadros más leves a la diarrea neonatal con presencia de heces acuosas amarillas o grises, provocando pérdida de peso y deshidratación.

- **LESIONES ANATOMOPATOLÓGICAS**

Las lesiones en la colibacilosis porcina podemos encontrar enteritis catarral, con vasos sanguíneos dilatados (Lazo *et al.*, 2009), dilatación del estómago que puede contener leche coagulada o alimento seco e intestinos dilatados con congestión de las paredes, edematosas, ganglios mesentéricos aumentados de tamaño e hiperémicos. El intestino grueso suele tener contenido mucoso a acuoso de color amarillento (Luppi, 2017; Zimmerman *et al.*, 2019).

- **DIAGNÓSTICO**

El examen clínico junto con las pruebas complementarias, ayudan a un buen diagnóstico de la enfermedad. La realización de necropsias en animales fallecidos o eutanasiados por sospecha de estas enfermedades, ayudan a corroborar las lesiones anatomopatológicas y recolectar muestras como segmentos de intestino delgado, en casos de ETEC, y colón, en casos de EPEC, para ser remitidos al laboratorio para cultivo bacteriológico y aislamiento del patógeno *E. coli* (Luppi, 2017). En animales con pocos signos clínicos, es aconsejable la recolección de heces o hisopado rectal. El aislamiento de la bacteria en medios específicos, como agar MacConkey y Agar Sangre, se complementa con las pruebas bioquímicas de tipificación correspondientes para su confirmación, como indol positivo, rojo de metilo positivo, citrato negativo, ureasa negativa, SH₂ negativo y Voges Proskauer negativo (Lazo *et al.*, 2009), así como la detección de factores de virulencia mediante PCR para la identificación de patotipos específicos (Luppi., 2017; Zimmerman *et al.*, 2019).

2.1.1.2 ENFERMEDAD DE LOS EDEMAS

- **SIGNOS CLÍNICOS**

La *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC) es el causante de la enfermedad de los edemas, principalmente en lechones después del destete, caracterizado por la aparición de edema a nivel de los párpados y frente, sin presencia de fiebre ni diarreas, así mismo puede causar muertes súbitas sin presentar signos clínicos (Casanova *et al.*, 2018; Zimmerman *et al.*, 2019). Los signos neurológicos también son vistos en cerdos en crecimiento que se caracteriza por la

presencia de ataxia, ceguera, marcha en círculos, posición de cúbito lateral con las patas en movimiento de pataleo (Casanova *et al.*, 2018). La enfermedad de los edemas suele presentarse en un grupo específico de animales, y la aparición abrupta de ésta desaparece rápidamente, en un promedio de 4 a 14 días; sin embargo, la mortalidad puede llegar hasta el 50% a 90% de los casos con la presencia de diarreas sanguinolentas como signo clínico terminal (Zimmerman *et al.*, 2019).

- **LESIONES ANATOMOPATOLÓGICAS**

En la enfermedad de los edemas, los lechones con muerte súbita no suelen presentar lesiones anatomopatológicas. Por otro lado, en lechones que siguen el curso del síndrome, es característico la presencia de edema a nivel de la submucosa del cardias gástrico y fundus. En el mesenterio puede encontrarse edematoso, al igual que los ganglios mesentéricos inflamados y congestionados. Puede encontrarse líquido seroso a nivel de la cavidad pericárdica, pleural y peritoneal, diferentes grados de edema pulmonar y edema laríngeo (Zimmerman *et al.*, 2019).

- **DIAGNÓSTICO**

El cultivo de bacterias procedentes del colon para su aislamiento en medios de cultivo específicos como Agar MacConkey y Agar Sangre con la presencia de colonias hemolíticas, ayuda al diagnóstico presuntivo; sin embargo, en enfermedades subagudas o crónicas se recomienda el diagnóstico a través de la presencia de lesiones, dado que estas cepas ya no se encuentran en forma dominante durante este periodo de la enfermedad (Zimmerman *et al.*, 2019).

Muchas veces el diagnóstico se complementa con el estudio histopatológico en busca de lesiones neurológicas, dado que es poco común el aislamiento de bacterias en el intestino en esta enfermedad (Zimmerman *et al.*, 2019). Entre los hallazgos histopatológicos se encuentran la malacia focal en el tallo cerebral, arteriopatía subaguda, hemorragia cerebral por ACV

(accidente cerebro vascular) por lesiones en arterias. (Lazo *et al.*, 2009; Zimmerman *et al.*, 2019).

2.1.1.3 TRATAMIENTO

En la colibacilosis entérica, la pérdida de líquidos y electrolitos por las diarreas es el principal problema en los lechones. Por ello, la rehidratación mediante suero fisiológico es esencial para regular el equilibrio electrolítico; sin embargo, la aplicación de estos por vía endovenosa es poco práctica, por lo que la hidratación intraperitoneal es la vía de elección para los casos graves (Lazo *et al.*, 2009; Luppi, 2017; Zimmerman *et al.*, 2019).

La terapia antibiótica se debe basar en los resultados del antibiograma para evitar el uso de antibióticos ineficaces debido a la resistencia bacteriana (Luppi, 2017). Dentro de los antimicrobianos a usar se considera aquellos que tengan buena disponibilidad a nivel intestinal, tales como: cefalosporinas, amoxicilina/ácido clavulánico, fluoroquinolonas, neomicina, apramicina, entre otros (Zimmerman *et al.*, 2019). Sin embargo, las cefalosporinas de tercera y cuarta generación y fluoroquinolonas, no son antibióticos de primera elección por ser consideradas de “importancia crítica en la medicina humana”, pues son los antimicrobianos usados como último recurso para infecciones multirresistentes en humanos (Lazo *et al.*, 2009; Zimmerman *et al.*, 2019).

Los lechones que muestran signos neurológicos tienen un pronóstico malo por el curso rápido de la enfermedad causando la muerte del lechón, por lo que no se recomienda el uso de antibióticos (Casanova *et al.*, 2018; Zimmerman *et al.*, 2019).

2.1.1.4 PREVENCIÓN

Las primeras medidas de prevención consisten en el buen manejo de la granja, evitando la sobrepoblación, manteniendo la buena higiene en agua y alimentos, buenas condiciones ambientales, adoptar técnicas de manejo como todo dentro - todo fuera y buen manejo al destete, evitando el destete prematuro (Madec *et al.*, 1998; Lazo *et al.*, 2009; Luppi, 2017).

Incluso, el manejo de las madres en piso aumenta la mortalidad de colibacilosis en las crías, a comparación del uso de baterías (Turcás *et al.*, 2012).

El uso de piensos con antibióticos también es usado como método de prevención en diferentes especies en muchos países, a pesar del riesgo que supone la resistencia antimicrobiana a nivel mundial (Rhouma *et al.*, 2017; Zimmerman *et al.*, 2019). Es por ello, que hoy en día hay diversos métodos de prevención como el uso de prebióticos y probióticos, como por ejemplo el uso de soja fermentada en el estudio de Kiers *et al.* (2003), redujo la gravedad de diarreas en lechones y aumentó el consumo alimenticio, por ende, aumento de peso diario. El uso de óxido de zinc en el alimento es otra alternativa frente a los aditivos antimicrobianos, actuando como protector de las células intestinales frente el ETEC inhibiendo la adhesión de éstas, mejorando el crecimiento de los lechones y disminuyendo las diarreas (Roselli *et al.*, 2003). Otra opción como aditivo en el pienso es el uso de péptidos antimicrobianos (AMP), por sus efectos antimicrobianos, propiedades inmunomoduladores y su poco desarrollo de resistencia, mejorando el crecimiento y digestibilidad (Wang *et al.*, 2016).

La vacunación también es parte de los métodos preventivos contra la colibacilosis, ayudando a controlar y prevenir la enfermedad. Por ejemplo, la vacuna oral contra la diarrea post destete, que contiene adhesinas fimbriales provenientes de *E. coli* vivos no patógenos son administrados vía oral a lechones destetados o una semana antes de destetar, ha mostrado protección, disminución de signos clínicos, y crecimiento normal de lechones aun después de la infección (Fairbrother *et al.*, 2017).

2.2 *Escherichia coli*

2.2.1 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS

Pertenece a la familia de las Enterobacteriaceae, es un bacilo Gram negativo considerado anaerobio facultativo, pueden o no tener flagelos para su movilidad y forma parte de la microbiota normal gastrointestinal de mamíferos y aves (Lopardo *et al.*, 2016).

A pesar de ser parte de la microbiota normal del intestino de mamíferos y aves, existen cepas que pueden causar enfermedades intestinales y extraintestinales en hospedadores inmunocomprometidos o al actuar como patógeno oportunista (Kaper *et al.*, 2014). Esta capacidad de causar enfermedades a diferentes especies se debe a la combinación de diferentes factores de virulencia codificados por genes, siendo la combinación de éstas la causante de patotipos de *E. coli* que causan enfermedades específicas (Kaper *et al.*, 2004). Estos patotipos tienden a compartir diferentes antígenos somáticos (O), flagelar (H) y capsular (K), así como las fimbrias o pili, parte del antígeno capsular tomando el nombre de K88, encargadas de la unión a los enterocitos lo cual termina con la colonización del intestino delgado (Van den Broeck *et al.*, 2000).

Se han descrito 6 patotipos causantes de las principales enfermedades gastrointestinales: *E. coli* enteropatógeno (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* productores de toxina Shiga (STEC, incluyendo *E. coli* enterohemorrágico, EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasivo (EIEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC). Estos patotipos tienen combinaciones de factores de virulencia que les aportan la capacidad de invadir al huésped y causar la enfermedad entérica que se caracteriza por la presencia clínica de diarrea (Kaper *et al.*, 2004).

2.2.2 PATOTIPOS Y PATOGENIA

2.2.2.1 *E. coli* ENTEROPATÓGENA (EPEC)

La EPEC es causante de diarrea en niños menores de 2 años de gran importancia por su alta gravedad y tasa de mortalidad (10-40 %), sobre todo en países poco desarrollados (Farfán-García *et al.*, 2016). Este patotipo es causante de diarreas acuosas en animales lactantes y jóvenes, debido a la lesión de adhesión y eliminación (A/E, del inglés *attaching and effacement*), lo que conlleva a la modificación de las vellosidades del enterocito para una unión óptima con la superficie epitelial (Farfán-García *et al.*, 2016; Malik *et al.*, 2017), esta unión

está mediada por la intimina, una proteína de membrana externa que es codificada por el gen *eae* que actualmente es utilizada para su diagnóstico molecular (Ochoa y Contreras, 2011); por otra parte, puede colonizar y provocar lesiones en cerdos destetados en condiciones normales de explotación sin manifestar diarreas, causando preocupación por la transferencia de genes de virulencia y resistencia antimicrobiana o posibles infecciones en personas por el consumo de productos a base de carnes poco cocidas (Malik *et al.*, 2012).

Las cepas de EPEC cuentan con un plásmido de virulencia conocido como factor de adherencia de la EPEC (EAF del inglés *EPEC adherence factor*), el cual codifica al pilus formador de haces (Bfp del inglés *bundle forming pilus*) que se encarga de la adherencia interbacteriana, para la formación de colonias bacterianas, y la adherencia localizada a las células epiteliales. La presencia de este plásmido se da en cepas de EPEC típicas (tEPEC), mientras que las cepas que no tengan este plásmido son conocidas como EPEC atípicas (aEPEC) (Trabulsi *et al.*, 2002), siendo la aEPEC la más prevalente en países desarrollados y subdesarrollados, causando incluso cuadros sin diarrea en humanos y animales, mientras que la tEPEC se ha encontrado exclusivamente en humanos.

La capacidad de causar o no diarrea de las aEPEC está asociada a la presencia de los genes *Efa1/lifA* (del inglés *EHEC factor for adherence 1/lymphocyte inhibitory factor A*), encargados de la adhesión e inhibición de la proliferación de linfocitos y producción de linfocinas, encontrándose una relación estadísticamente significativa en la asociación de la presencia de estos genes con diarreas causadas por cepas aEPEC (Slinger *et al.*, 2017).

Una vez unida la bacteria al enterocito se acumulan diferentes proteínas, tales como la proteína quinasa C (PKC), fosfolipasas C, se activan cinasas de la cadena ligera de miosina y las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAP) lo que conduce a un aumento en la permeabilidad de las células. Se activa el factor nuclear (NF) κ B, conduciendo a la producción de interleuquina 8 (IL-8) y respuesta inflamatoria. Todos estos mecanismos dan como resultado

la formación de diarreas por diferentes mecanismos, como aumento de permeabilidad intestinal, inflamación intestinal y pérdida de superficie de absorción (Kaper *et al.*, 2004)

2.2.2.2 *E. coli* ENTEROTOXIGÉNICA (ETEC)

La ETEC es una de las más importantes causas de diarreas acuosas post destete en animales jóvenes, sobre todo cerdos y terneros, y causando grandes pérdidas económicas en lechones durante las dos primeras semanas después del destete (Nagy y Fekete, 2005), así como de las principales causas de la diarrea del viajero en humanos. Las diarreas post destete en lechones causados por *E. coli* se han asociado a diferentes factores tales como la edad al destete y la cantidad de anticuerpos que han sido proporcionados a través del calostro por la madre (Fairbrother *et al.*, 2005).

Los principales factores de virulencia de la ETEC son las adhesinas, también conocidas como fimbrias o pili, y enterotoxinas. Las adhesinas se encargan de la adherencia de la bacteria a los enterocitos sin causar cambios en la estructura de las células, estas adhesinas o fimbrias en la ETEC porcina son la F4 y F18 que se adhieren a través de receptores específicos presentes en los enterocitos (Fairbrother *et al.*, 2005). La presencia de estos receptores es crucial para la colonización de la ETEC, por lo que determina la susceptibilidad de los cerdos a este patotipo (Nagy y Fekete, 2005; Rhouma *et al.*, 2017). Una vez adherida al enterocito, las cepas de ETEC producen enterotoxinas termolábiles (LT) y/o enterotoxinas termoestables (STa y STb). Las enterotoxinas LT son producidas por ETEC humana y porcina, mientras que las enterotoxinas ST por ETEC humano, bovino y porcino. Estas enterotoxinas producen diferentes cambios en los enterocitos, provocando aumento en la secreción de agua, sodio (Na⁺) y cloro (Cl⁻) y disminución de la absorción de líquidos (Nagy y Fekete, 2005). La enterotoxina LT consta de un dominio A y 5 subunidades B, estas subunidades se unen al gangliósido GM1 que se encuentran en las superficies celulares, lo que conlleva que un fragmento de la toxina A (A1)

ingrese hasta el retículo endoplasmático y active el adenilato ciclasa aumentando el AMPc, dando como resultado incremento en la secreción de líquidos y electrolitos y disminución en la absorción (Fairbrother *et al.*, 2005; Nagy y Fekete, 2005). La enterotoxina ST se divide en dos variantes, la primera STa está asociada a cerdos y terneros y es la única en humanos (Kaper *et al.*, 2004), estimula el sistema de guanilato ciclasa, lo que lleva a la acumulación intracelular de GMPc, reduce la absorción de agua y electrolitos y eleva la secreción de Cl⁻ y agua en las células de la cripta (Fairbrother *et al.*, 2005; Nagy y Fekete, 2005). Por otro lado, el STb es característico de la ETEC porcina (Nagy y Fekete, 2005), puede elevar las concentraciones de Ca²⁺ citosólico, estimula la liberación de prostaglandinas E y la liberación de serotonina, lo que conduce a la secreción de iones (Kaper *et al.*, 2004).

2.2.2.3 *E. coli* PRODUCTORAS DE TOXINA SHIGA (STEC)

LA STEC se caracteriza por la producción de la toxina Shiga (Stx) codificada por el gen *stx*, la cual es responsable de la colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico (SUH) y diarreas no sanguinolentas en humanos (Kaper *et al.*, 2004). En el caso de los porcinos es la responsable de la enfermedad de los edemas, sobre todo en el periodo de destete, observándose diferentes signos clínicos que incluyen edema subcutáneo y alteraciones neurológicas como convulsiones, ataxia, parálisis y alteraciones de la voz (Clugston *et al.*, 1974; Casanova *et al.*, 2018). La Stx es la principal responsable de la enfermedad de los edemas en cerdos, siendo específicamente la Stx2e, que se caracteriza por unirse al receptor Gb3 y Gb4 en micro vellosidades del yeyuno e íleon de porcinos para luego ser absorbidos al sistema circulatorio causando daños vasculares (Casanova *et al.*, 2018; Zimmerman *et al.*, 2019) que se han identificado como necrosis a nivel del endotelio al inhibir la síntesis de proteínas a nivel del ribosoma 60S, que aumentan la permeabilidad vascular (Matise *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2016).

2.2.2.4 *E. coli* ENTEROAGREGATIVA (EAEC)

Ahora considerada un patógeno emergente, pues los casos en niños y adultos han ido en aumento causando diarreas agudas (Kaper *et al.*, 2004; Navarro-García y Elias, 2011), que se caracteriza por la adherencia a las células HEp-2 dando la apariencia de “ladrillos apilados”, denominándose patrón de adherencia agregativa (patrón AA), descrita por Nataro *et al.* (1987), que no solo se encuentran en las cepas de la *E. coli* enteroagregativa, sino también en diferentes cepas diarreogénicas. Es por ello que la detección de éstas no solo requiere la detección de AA in vitro, sino también que no muestren otros marcadores genéticos de otros patotipos de *E. coli* diarreogénicos (Gomes *et al.*, 2016).

La EAEC puede causar daños inflamatorios leves a nivel intestinal, sobre todo en el colon, aunque en animales la invasión es más limitada (Kaper *et al.*, 2004). Es común la presencia de diarreas agudas, que pueden ser acuosas con o sin sangre, llegando a ser persistente (Gomes *et al.*, 2016, Navarro-García y Elias, 2011).

La infección por EAEC comienza por la adherencia de la bacteria a la mucosa intestinal a través de las fimbrias de adherencia agregativa (AAF del inglés *aggregative adherence fimbria*) que ayudan a la formación del patrón AA (Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2014; Gomes *et al.*, 2016). El intestino colonizado forma excesivo moco, que es seguido de la formación de una biopelícula, importante en la patogenicidad de la EAEC, pues ayuda a evitar la respuesta del sistema inmune y antimicrobianos (Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2014). Las lesiones causadas por la EAEC a nivel de la mucosa intestinal está mediado por diversas toxinas: la toxina enteroagregativa termoestable 1 (EAST-1) que aumenta la secreción de cloruro, dando como resultado la diarrea secretoria; toxina codificada por plásmidos (Pet, del inglés *plasmid-encoded toxin*), que induce efectos citotóxicos al dividir la espectrina del citoesqueleto celular, llegando a deformar la célula; proteína involucrada en la colonización (Pic, del inglés *protein involved in intestinal colonization*) con actividad mucinasa, de hemaglutinación y resistencia

sérica para la colonización intestinal; enterotoxina 1 de *Shigella* (ShET1), que puede ayudar a la diarrea secretoria de la EAEC (Navarro-García y Elias, 2011; Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2014).

2.2.2.5 *E. coli* ENTEROINVASIVA (EIEC)

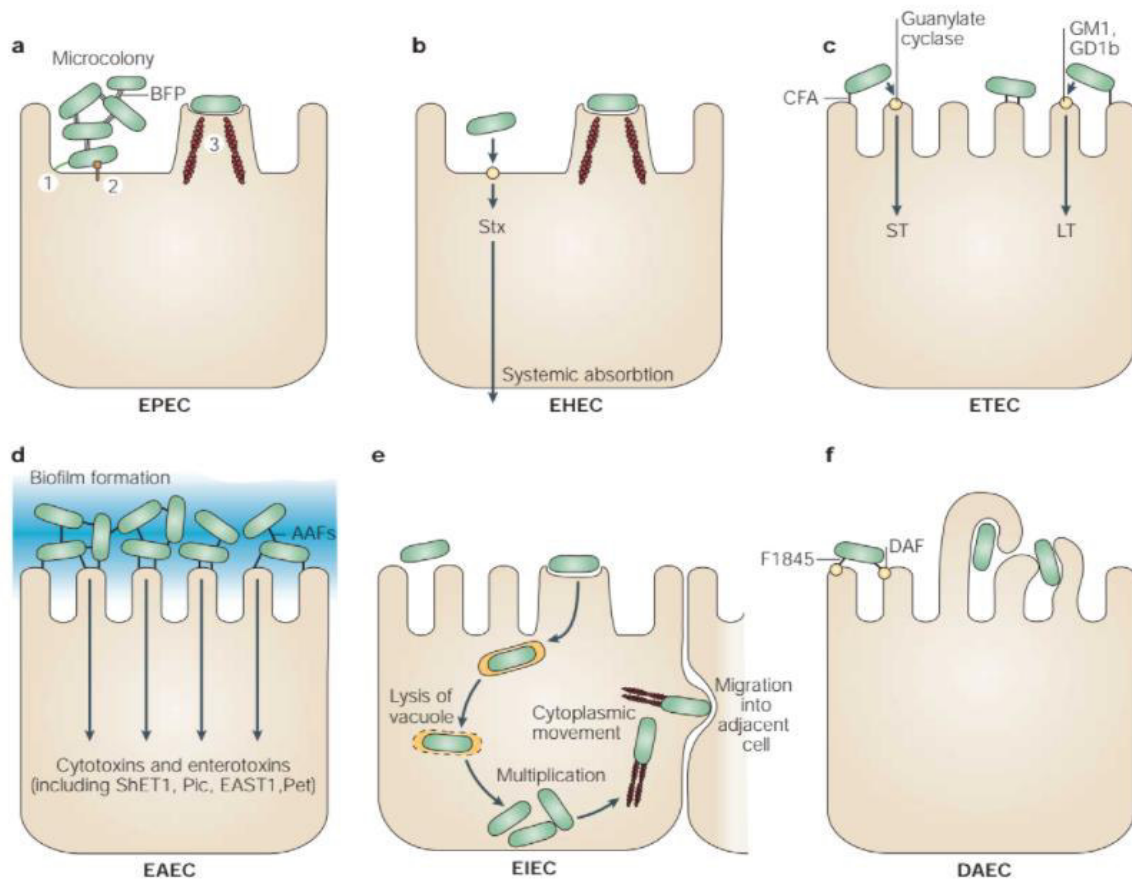
La EIEC es la responsable, junto con *Shigella spp.*, de la disentería bacilar o shigelosis en humanos, causando cuadros diarreicos mucosos o sanguinolentos, afectando principalmente a niños menores de 5 años en países en desarrollo (Belotserkovsky y Sansonetti, 2018). La EIEC tiene la característica de invadir y penetrar el epitelio del colon al igual que *Shigella*, pero comparte características bioquímicas con *E. coli* (Beld y Reubsæet, 2011; Belotserkovsky y Sansonetti, 2018). Las bacterias al entrar en contacto con el epitelio intestinal penetran las células M a través de vacuolas endocíticas hasta llegar a la submucosa, siendo fagocitadas por los macrófagos y células dendríticas de la zona, donde se multiplican y ocasionan la muerte celular; cuando las EIEC se encuentran libres, pueden invadir los enterocitos por endocitosis. (Kaper *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2016; Belotserkovsky y Sansonetti, 2018). La capacidad de colonización e invasión de las EIEC depende de la presencia de un plásmido grande denominado *pInv*, quien contiene a los genes de virulencia; la ausencia de este plásmido está asociado a cepas no virulentas (Gomes *et al.*, 2016).

2.2.2.6 *E. coli* DE ADHERENCIA DIFUSA (DAEC)

La DAEC está relacionada a la presencia de diarreas acuosas persistentes en niños, que se caracteriza por la presencia de patrón de adherencia difusa (DA del inglés *diffusely adherent*) a las células HEp-2 (Kaper *et al.*, 2004). Las adhesinas Dr/Afa se unen a sus receptores DAF (del inglés *decay-accelerating factor*) presentes en el epitelio intestinal de humanos, encargadas de regular la cascada del complemento, provocando la DA característica de este patotipo (Kaper *et al.*, 2004; Bouguéneç y Servin, 2006). Además, otro factor de virulencia relacionado es la toxina autotransportadora secretada (*Sat* del inglés *secreted autotransporter*

toxin), así como factores que ayudan a la adquisición de hierro, que ayuda a la supervivencia de la *E. coli* (Meza-Segura *et al.*, 2020). La unión de las bacterias al enterocito a través de las adhesinas lleva a la modificación de los enterocitos formando extensiones largas que envuelven a la bacteria, esta interacción provoca la activación del sistema de complemento y la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI-3-quinasa) (Kaper *et al.*, 2004). El alargamiento de los enterocitos conduce a lesiones, pérdida de microvellosidades y disminución en la actividad enzimática, que junto con el factor de virulencia *Sat*, aumentan la permeabilidad celular, dando lugar a respuestas pro inflamatorias junto con la presencia de flagelos como factor de virulencia (Servin, 2014; Bouguéneq y Servin, 2006).

Figura 1. Esquema de patogenia de *E. coli* diarreogénicas (Kaper *et al.*, 2004).



Las seis categorías reconocidas de diarreas *E. coli* cada uno tiene características únicas en su interacción con las células eucariotas. Aquí, la interacción de cada categoría con una célula objetivo típica se representa esquemáticamente. a) Las EPEC se adhieren a los enterocitos del intestino delgado, pero destruyen la arquitectura de las vellosidades, lo que induce la lesión característica de adhesión y eliminación. Los trastornos del citoesqueleto van acompañados de una respuesta inflamatoria y diarrea. 1. Adhesión inicial, 2. Translocación de proteínas por secreción de tipo III, 3. Formación de pedestal. b) La ECEH también induce la lesión de adhesión y eliminación, pero en el colon. La característica distintiva de EHEC es la elaboración de la toxina Shiga (Stx), cuya absorción sistémica conduce a complicaciones potencialmente mortales. c) De manera similar, ETEC se adhiere a los enterocitos del intestino delgado e induce diarrea acuosa por la secreción de enterotoxinas termolábiles (LT) y/o termoestables (ST). d) La EAEC se adhiere al epitelio del intestino delgado y grueso en una biopelícula gruesa y elabora enterotoxinas secretoras y citotoxinas. e) El EIEC invade la célula epitelial del colon, lisa el fagosoma y se mueve a través de la célula nucleando filamentos de actina. Las bacterias pueden moverse lateralmente a través del epitelio mediante la diseminación directa de célula a célula o pueden salir y volver a entrar en la membrana plasmática basolateral. f) La DAEC provoca un efecto característico de transducción de señales en los enterocitos del intestino delgado que se manifiesta como el crecimiento de proyecciones celulares largas en forma de dedos, que envuelven las bacterias. AAF, fimbrias de adherencia agregada; BFP, pilus formadores de haces; CFA, antígeno del factor de colonización; DAF, factor de aceleración de la descomposición; EAST1, *E. coli* enteroagregativo ST1; LT, toxina termolábil; SHET1, Shigella enterotoxina 1; ST, toxina termoestable.

2.3 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

2.3.1 GENERALIDADES

La resistencia antimicrobiana se ha convertido en una problemática importante en la salud pública, que involucra tanto humanos como animales, y afecta notablemente los resultados de un tratamiento a una enfermedad específica. Se han establecido factores que propician la resistencia, tales como el uso excesivo de antibióticos, sobre todo en infecciones que no las requieren, dosis incorrectas de los medicamentos o tratamientos incompletos por falta de recursos económicos (OMS, 2001). Por ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido estrategias para contener la resistencia contra los antimicrobianos tanto en la salud humana como animal, una de las cuales consiste en la vigilancia de resistencia antimicrobiana mediante métodos clasificados en *in vivo* e *in vitro*. En este último se encuentran la clasificación fenotípica y molecular (pruebas genéticas).

El uso inadecuado de antibióticos en los animales, como la sub-dosificación, ha favorecido la selección de bacterias resistentes (Burow *et al.*, 2014), encontrándose incluso en bacterias de la microbiota intestinal de animales y humanos, donde la *E. coli*, por ser parte de esta microbiota normal, es considerada un indicador para la prevalencia de resistencia antimicrobiana para diferentes especies (Van den Bogaard y Stobberingh, 2000).

Muchas de las infecciones de *E. coli* en personas es por el consumo o manipulación de alimentos contaminados, así como el consumo de carnes poco cocidas, la presencia de cepas de *E. coli* resistente a antimicrobianos en animales aparentemente sanos causa preocupación al servir como reservorio de genes de resistencia (Malik *et al.*, 2012)

2.3.2 IMPORTANCIA EN LA SALUD ANIMAL Y PÚBLICA

El aumento del uso de antimicrobianos en el mundo, tanto en animales como humanos, ha llevado a una creciente resistencia antimicrobiana en bacterias patógenas y comensales, dando como resultado una diseminación de bacterias resistentes y junto con ellas, genes de resistencia

(Van den Bogaard y Stobberingh, 2000). La continua exposición a estos antimicrobianos, no solo como agentes terapéuticos, sino también como promotores de crecimiento, dio como resultado la formación de mecanismos de defensa más eficientes al ser multidrogo resistentes (MDR), que se caracteriza por la acción de diversos mecanismos (alteraciones enzimáticas, entre otros) que confieren resistencia a múltiples antimicrobianos (Alekhun y Levy, 2007; Szmolka y Nagy, 2013).

Se han considerado los hospitales como un entorno de bacterias resistentes; sin embargo, los reservorios de estas bacterias y genes de resistencia están más relacionados a la producción animal, el cual ha utilizado antibióticos en los alimentos como promotor de crecimiento durante muchos años, favoreciendo la propagación de genes de resistencia y la transferencia de éstos a bacterias comensales y/o patógenas (Van den Bogaard y Stobberingh, 2000; Avguštin, 2012); estas bacterias presentes en animales, en la microbiota intestinal o patógenas, pueden infectar a los humanos por contacto directo o a través de alimentos de origen animal (Van den Bogaard y Stobberingh, 2000). Los datos obtenidos por la FDA (2009), demuestran que el 80% de los antibióticos utilizados fueron para uso no humano en Estados Unidos, del cual el 64% fue usado como promotor de crecimiento en animales sanos.

Diferentes estudios de resistencia antimicrobiana en *E. coli* de animales y humanos han demostrado la importancia del reservorio de bacterias resistentes a antimicrobianos en cerdos, que a través de transferencia de genes pueden ser pasados de bacterias patógenas a comensales e incluso entre diferentes familias bacterianas (Avguštin, 2012). Szmolka *et al.* (2011), reportaron que la transferencia de genes *qnrS1* (gen de resistencia a quinolonas) por plásmidos pueden ocurrir entre *Salmonella* y *E. coli* de origen animal y humano. Además, los cerdos representan un reservorio resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (PMQR del inglés *plasmid-mediated quinolone resistance*) para el gen *qnrS1* en Europa. El uso de antimicrobianos como aditivos alimentarios y tratamiento se ve mayormente en la producción

porcina, lo que ha llevado que presenten una alta prevalencia de cepas de *E. coli* resistentes a antimicrobianos, sobre todo la alta resistencia a las tetraciclinas (96.3%), estreptomicina (66.8%), ampicilina (66.1%) y cloranfenicol (46.6%) en porcinos aparentemente sanos (Lim *et al.*, 2007). Estos hallazgos también se vieron presentes en varios estudios como los realizados por Monterroso *et al.* (2019) en nuestro país, donde todos los aislados de *E. coli* de infecciones entéricas de porcinos fueron resistentes por lo menos a un antibiótico pertenecientes a los grupos de los betalactámicos, quinolonas o aminoglucósidos, donde hubo altos porcentajes de resistencia al ácido nalidíxico, cloxacilina y amoxicilina-ácido clavulánico, así como un 86% de estos aislados presentaron un fenotipo MDR a tres o más familias de antimicrobianos.

2.3.3 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS PRINCIPALES ANTIBIÓTICOS

CONTRA *E. coli*

2.3.3.1 TETRACICLINAS

Uno de los antibióticos más utilizados en la producción de alimentos para animales, considerado un antimicrobiano de amplio espectro que se caracteriza por llegar al ARNr 16S e inhibir la traducción de proteínas al evitar la unión del aminoacil- ARNt al receptor ribosómico (Chopra y Roberts, 2001; Alekshun y Levy, 2007). El uso de tetraciclinas en la terapia antimicrobiana en granjas porcinas está ampliamente utilizado, así como su uso como promotor de crecimiento a dosis subterapéuticas (Chopra y Roberts, 2001), considerándose uno de los antibióticos más utilizados junto con las sulfonamidas, trimetoprima y colistina, encontrando en microorganismos aislados de cerdos de suiza resistencia a estos antimicrobianos a excepción de la colistina (Lanz *et al.*, 2003; Brand *et al.*, 2017).

El sistema de eflujo es el mecanismo más común de resistencia contra este antimicrobiano sobre todo en Gram negativas, el cual es codificado en su mayoría por 18 genes *tet* y una *otr*, mientras que algunos otros 7 genes *tet* y un *otr* codifican para proteínas de protección ribosomal (Chopra y Roberts, 2001). Las bacterias Gram negativas codifican el sistema de eflujo por los

genes *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetI* y *tetY*, encontrándose todos en *E. coli* (Mosquito *et al.*, 2011), siendo el gen *tetA* y *tetB* los más frecuentes en porcinos y muy poco frecuente el *tetC* (Lanz *et al.*, 2003; Sheikh *et al.*, 2012).

2.3.3.2 BETALACTÁMICOS

Los betalactámicos pertenecen al grupo de antibióticos más importantes en la medicina humana, siendo el primero en aparecer las penicilinas seguida de las cefalosporinas; su alto uso ha provocado la aparición de resistencia a la mayoría de estos antibióticos por distintos mecanismos de resistencia (Fisher *et al.*, 2005; Östürk *et al.*, 2015). Los betalactámicos, como la ampicilina, se encargan de interferir en las últimas fases de la síntesis de peptidoglicano, encargado de la formación de la pared bacteriana, siendo las β -lactamasas las enzimas encargadas de hidrolizar el enlace amida del núcleo betalactámico dando como resultado la inactivación del antimicrobiano (Mosquito *et al.*, 2011). La aparición rápida de las β -lactamasas y de nuevos antibióticos betalactámicos trajo como consecuencia la aparición de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) con resistencia a las cefalosporinas (Fisher *et al.*, 2005). De la gran cantidad de β -lactamasas que hay en la actualidad, los más comunes en enterobacterias son codificados por los genes *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*OXA-1 y *bla*CARB (Mosquito *et al.*, 2011).

2.3.3.3 CLORANFENICOL

EL cloranfenicol es un antibiótico de amplio espectro contra bacterias Gram positivas, Gram negativas, Rickettsias, micoplasmas y clamidias (Schwarz *et al.*, 2004; Mosquito *et al.*, 2011), debido a su capacidad de atravesar membranas biológicas para actuar contra bacterias intracelulares e incluso atravesar la barrera hematoencefálica. El cloranfenicol actúa inhibiendo la biosíntesis de proteínas debido a la prevención de la elongación de la cadena peptídica. El uso de este medicamento está siendo ampliamente regulado en medicina

humana e incluso en la medicina veterinaria en animales de producción, debido a sus efectos adversos, tales como la anemia aplásica irreversible (Schwarz *et al.*, 2004).

2.3.3.4 TRIMETOPRIM - SULFAMETAXOL

Las sulfonamidas en la medicina se han usado durante décadas contra bacterias y protozoos causando una rápida aparición de resistencia, lo que condujo al uso conjunto con otros antimicrobianos como las diaminopirimidinas como el trimetoprim; estos antimicrobianos son usados en infecciones urinarias en humanos y en enfermedades del tracto gastrointestinal en medicina veterinaria (Perrenten y Boerlin, 2003; Mosquito *et al.*, 2011). Las sulfonamidas son consideradas antibióticos selectivos al ir contra la formación del ácido fólico, inhibiendo competitivamente la dihidropteroato sintasa (DHPS) evitando la formación del ácido dihidropteroico (Sköld, 2000), en el caso de trimetoprim inhibe la enzima dihidrofolato reductasa (*dfr*) importantes para la síntesis del ácido fólico (Mosquito *et al.*, 2011).

La resistencia contra las sulfonamidas es dada por mutaciones del gen DHPS cromosómicos (*folP*) o con mayor frecuencia por adquisición de un gen DHPS alternativo (*sul*). En *E. coli* se conocen tres genes de resistencia: *sul1*, *sul2* y *sul3* (Perrenten y Boerlin, 2003; Mosquito *et al.*, 2011).

2.3.3.5 QUINOLONAS

Usado en sus inicios contra infecciones urinarias, hoy en día forma parte de los antibióticos más usados en el mundo en medicina humana, siendo eficaz contra Gram negativos y Gram positivos. Su acción contra las bacterias radica en bloquear las funciones de dos enzimas topoisomerasas bacterianas tipo II: ADN girasa y topoisomerasa IV, los cuales se encargan de separar las hebras de doble hélice del ADN para luego volverla a sellar con otra hebra de ADN (Mosquito *et al.*, 2011; Aldred *et al.*, 2014). Estas enzimas están compuestas por dos subunidades GyrA y dos subunidades GyrB para el ADN girasa, y dos subunidades ParC y dos ParE para la topoisomerasa IV, donde alguna modificación de éstas puede causar resistencia a

las quinolonas. Las mutaciones de resistencia se han visto comúnmente en los dominios aminos terminales del GyrA o ParC denominándose región determinante de la resistencia a las quinolonas (QRDR); esta resistencia es conferida por el gen *qrn*, que posteriormente fue conocido como gen *qrnA* al encontrarse diferentes alelos, el cual se localiza en plásmidos que facilitan su diseminación (Hooper y Jacoby, 2015).

2.3.3.6 AMINOGLUCOSIDOS

Este grupo de antibióticos son considerados bactericidas, descubiertos principalmente para el tratamiento de la tuberculosis. Éstos actúan a nivel de la subunidad 30S de los ribosomas bacterianos, impidiendo la síntesis de proteínas y así provocar la muerte bacteriana. Para lograr anclarse a la subunidad 30S, el antibiótico debe adentrarse a la célula a través de canales de porina, denominándose difusión pasiva, para luego transportarse hacia el citoplasma activamente (Park, 2009; Doi *et al.*, 2016).

El aumento de la resistencia bacteriana contra este antibiótico ha llevado a un amplio estudio sobre los diversos mecanismos de resistencia, entre los cuales están: disminución de la permeabilidad y aumento en el flujo de salida, modificación de la subunidad 30S del ribosoma y mecanismos enzimáticos que modifican al antibiótico (Jana y Deb, 2006; Park, 2009; Doi *et al.*, 2016). Este último mecanismo es causado por las enzimas acetiltransferasas, nucleotidiltransferasas y fosfotransferasas. Estas enzimas son codificadas por genes que se encuentran generalmente en plásmidos, transposones e integrones, lo que facilita su transferencia y aumenta la resistencia contra esta familia de antibióticos entre las bacterias (Jana y Deb, 2006).

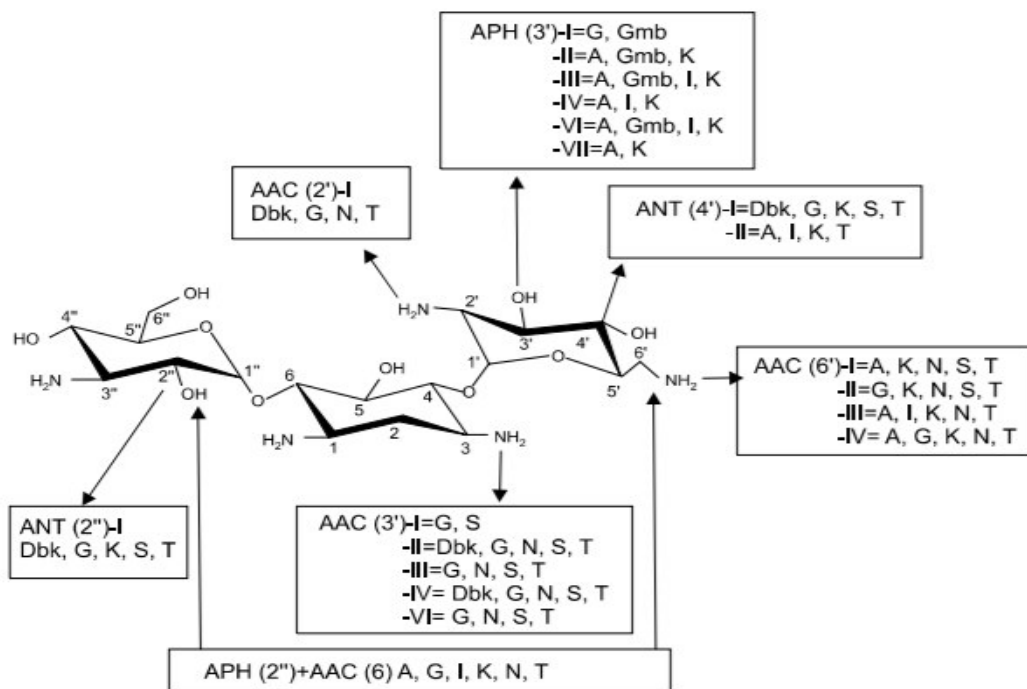
2.3.4 MECANISMOS DE RESISTENCIA

2.3.4.1 MODIFICACION DE LA MOLECULA ANTIBIOTICA

- **ALTERACIONES QUÍMICAS**

La producción de enzimas que son capaces de alterar de manera química a los antibióticos es uno de los principales mecanismos de resistencia presentes en bacterias Gram negativas y Gram positivas, son conocidas varias enzimas capaces provocar reacciones bioquímicas tales como la acetilación, fosforilación y adenilación. Un ejemplo de éstas son las enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AME), alterando los grupos hidroxilo y amino de los aminoglucósidos (Munita y Arias, 2016). La modificación enzimática contra los aminoglucósidos resulta en una disminución en la afinidad del antimicrobiano contra su objetivo ribosómico, se conocen tres enzimas capaces de alterar a los aminoglucósidos: acetiltransferasas (AAC), nucleotidiltransferasas (ANT) y fosfotransferasas (APH) (**Figura 2**); muchos de estos se encuentran en elementos genéticos móviles (Jana y Deb, 2006).

Figura 2. Representación de diferentes tipos de enzimas modificadoras de aminoglucósidos y sus sustratos (Park, 2009).



A:

Amikacina, Dbk: Dibekacina, G: Gentamicina, Gmb: Gentamicina B, I: Isepamicina, K: Kanamicina, N: Netilmincina, S: Sisomicina, T: tobramicina

- **DESTRUCCIÓN DE LA MOLÉCULA ANTIBIÓTICA**

Un ejemplo de éstos son las enzimas conocidas como β -lactamasas, que se encarga de hidrolizar el enlace amida del anillo β -lactámico de penicilinas y carbapenémicos, provocando la inactivación del antimicrobiano (Mosquito *et al.*, 2011; Munita y Arias, 2016). La aparición de otros antimicrobianos capaces de inhibir las β -lactamasas, ayudó a la aparición de las β -lactamasas de espectro extendido, resistentes a las cefalosporinas. Las β -lactamasas se clasificaron en 4 clases (A-D), de los cuales la clase A, C y D tienen el mecanismo de hidrólisis del éster de serina, mientras que la clase B tienen un ion zinc que participa en la catálisis (Öztürk *et al.*, 2015).

2.3.4.2 DISMINUCIÓN DE LA PENETRACIÓN DE ANTIBIOTICOS Y EFLUJO

- **DISMINUCIÓN DE LA PERMEABILIDAD**

Una de las características de las bacterias Gram negativas es la presencia de una membrana externa, evitando que el antibiótico llegue a su objetivo, actuando como la primera línea de defensa conformada por una bicapa lipídica prácticamente impermeable, cuyo pasaje es controlada mayormente por las porinas (Munita y Arias, 2016).

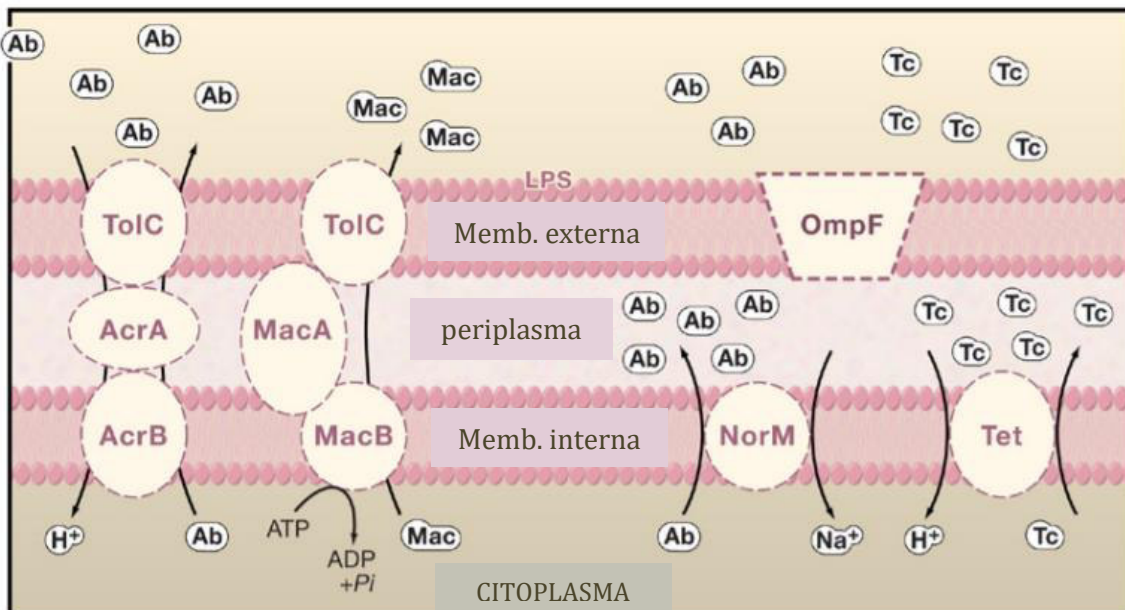
Tanto los β -lactámicos como las fluoroquinolonas ingresan a las bacterias a través de las porinas por ser moléculas hidrofílicas; sin embargo, las bacterias modifican la porina para evitar el ingreso de los β -lactámicos: cambio a nivel de la expresión de la porina, intercambio en el tipo de porina o mutación de la porina que afecta la función del canal de porina (Pagès *et al.*, 2008). La presencia de estas modificaciones que disminuyen la permeabilidad da una resistencia baja que se complementa con la presencia de bombas de eflujo (Munita y Arias, 2016).

- **BOMBAS DE EFLUJO**

La capacidad de las bacterias de expulsar compuestos tóxicos fuera de la célula es uno de los mecanismos de resistencia antimicrobiana. Este mecanismo de resistencia se encontró en *E. coli* contra las tetraciclinas por medio de intercambio de protones y sodio (Munita y Arias, 2016).

Muchas de estas bombas de eflujo se encuentran principalmente en bacterias Gram negativas, ayudando a disminuir la concentración de antimicrobianos en el interior de la célula. Estas proteínas de eflujo se dividen en dos tipos: transportadores de tetraciclinas (Tet) y macrólidos (Mef) que pueden actuar sobre diversos agentes del mismo grupo de antimicrobianos (**Figura 3**) (Alekhshun y Levy, 2007). En las tetraciclinas, el mecanismo de resistencia más común son las bombas de eflujo, codificados por los genes: *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetI* y *tetY*, reportados en *E. coli* (Mosquito *et al.*, 2011).

Figura 3. Sistema de eflujo de antibióticos (Alekhshun y Levy, 2007).



*Representación de una bacteria gram negativa. Algunos sustratos de AcrAB (Ejm: Aminoglucósidos) son reconocidos por una porción de AcrB que mira hacia el citoplasma, mientras que otros (Ejm: Tetraciclinas) migran a través de la membrana interna hacia un bolsillo de unión a AcrB. Los sistemas de eflujo AcrAB-TolC y Tet de *E. coli* son transportadores secundarios que utilizan la fuerza motriz del protón (H⁺) mientras que Norm (vibrio spp.) es un transportador secundario que aprovecha un gradiente de iones de sodio (Na⁺) para impulsar el flujo de salida.*

MacAB es un transportador primario que utiliza la energía derivada de la hidrólisis de ATP para impulsar el flujo de salida. Los sistemas de un solo componente transportan sustratos a través de la membrana interna donde luego se difunden a través de las porinas (Ejm: OmpF) o membrana externa en el medio extracelular. Los sistemas multicomponente como AcrAB-TolC y MacAB-TolC dirigen el transporte de sustratos al medio extracelular. Abreviaturas: LPS, lipopolisacárido; Ab, antibiótico; Tc, tetraciclina; Mac, macrólido.

2.3.4.3 CAMBIOS DE MOLÉCULAS DIANA

- **PROTECCIÓN**

Otro mecanismo de resistencia es la protección del objetivo antimicrobiano, pues da como resultado la interrupción de unión del antimicrobiano a su sitio diana, evitando la acción contra la bacteria. Este mecanismo es utilizado contra tetraciclinas y fluoroquinolonas (Munita y Arias, 2016). La protección ribosomal, en el caso de las tetraciclinas, está dado por los genes *tetM*, *tetO*, *tetS*, *tetW*, *tetQ* y *tetT* (Mosquito *et al.*, 2011), que confieren una actividad GTPasa y facilitan la liberación del antibiótico del ribosoma mediante mecanismos dependientes de energía (Alekshun y Levy, 2007).

- **MODIFICACIÓN DEL SITIO DE ACCIÓN CELULAR**

Uno de los mecanismos más importantes en resistencia antimicrobiana. Este mecanismo se podría agrupar en: mutaciones de genes que codifican el sitio diana, alteraciones enzimáticas del sitio diana y reemplazo o desvío de la diana, provocando una disminución en la unión de los antimicrobianos a su sitio de unión (Munita y Arias, 2016).

- **Mutaciones de genes que codifican el sitio diana**

Este mecanismo es usado contra antimicrobianos como las fluoroquinolonas, rifampicina y oxazolidinonas. En el caso de las quinolonas, donde el sitio de unión es el ADN-girasa (compuestas por dos subunidades codificadas por *gyrA* y *gyrB*) en Gram negativas (**Figura 4**), el cambio en esta estructura es el principal mecanismo de resistencia, el cual se debe a la mutación del codón 83 y en las fluoroquinolonas esta mutación se da a nivel del *gyrA*, logrando así un alto nivel de resistencia contra estos antimicrobianos (Mosquito *et al.*, 2011).

- **Alteraciones enzimáticas del sitio diana**

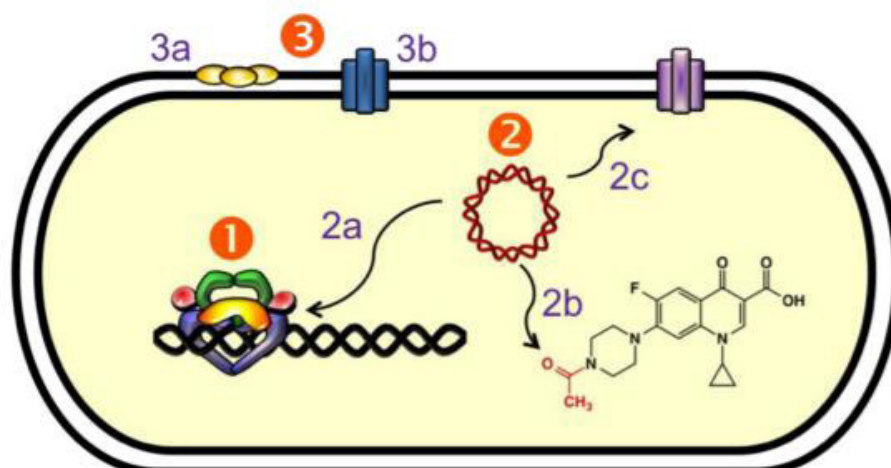
Un buen ejemplo es la metilación del ribosoma por una enzima codificada por el gen *emr* (metilación ribosomal de eritromicina), dando resistencia contra el grupo de los macrólidos. La expresión de este gen puede conferir resistencia cruzada contra el grupo de las MLS (macrólido-lincomicina-estreptogramida) (Alekhshun y Levy, 2007; Munita y Arias, 2016).

La función de metilación ribosomal puede alterar la función bacteriana, por lo que hay una regulación postranscripcional, provocando que las bacterias que no crecen en un medio con antimicrobianos no puedan expresar la proteína capaz de dar la resistencia y al estar en presencia del antimicrobiano, la transcripción se activa para dar rápidamente la resistencia. Hay una gran distribución de este gen entre bacterias Gram negativas y positivas, explicado por su presencia en elementos genéticos móviles (Munita y Arias, 2016).

- **Reemplazo o desvío de la diana**

Este mecanismo explica la capacidad de las bacterias de formar nuevos sitios diana donde los antimicrobianos se unan y no inhiban a la bacteria. Este mecanismo va en contra de las vancomicinas y metilina. La derivación de la vía metabólica también es usada contra otros antimicrobianos como el trimetoprim - sulfametoxazol, produciendo un exceso de sitios diana. La metilina, derivado de la penicilina, debe su resistencia a la presencia de una proteína fijadora de penicilina (PBP), alterando la síntesis de peptidoglucanos por la inhibición de la PBP (Munita y Arias, 2016).

Figura 4. Mecanismo de resistencia a las quinolonas (Aldred *et al.*, 2014).



1) Resistencia mediada por el objetivo: Las mutaciones en girasa y topoisomerasa IV debilitan las interacciones de las enzimas-quinolonas. 2) Resistencia mediada por plásmidos: (2a): Las proteínas Qnr (amarillas) disminuyen la unión de la topoisomerasa-ADN y protegen los complejos enzima-ADN de las quinolonas; (2b) Aac(6')-Ib-cr es un aminoglucósido acetiltransferasa que acetila el nitrógeno libre en el anillo C7 de ciprofloxacino y la norfloxacina, disminuyendo su efectividad; (2c) las bombas de salida codificadas por plásmidos reducen la concentración de quinolonas en la célula. 3) resistencia mediada por cromosomas: (3a) la sub expresión de porinas en especies gram negativos disminuye la absorción del fármaco, (3b) la sobre expresión de las bombas de salida codificadas por cromosomas disminuye la retención del fármaco en la célula.

2.3.5 GENÉTICA DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

La notable plasticidad genética en las bacterias ha permitido que sean capaces de sobrevivir a las amenazas ambientales, incluso a moléculas antimicrobianas que amenazan su supervivencia. Esto se debe a distintos mecanismos que afectan las moléculas antimicrobianas, éstas utilizan estrategias genéticas tales como mutaciones de genes y adquisición de ADN extraño que codifica determinantes de resistencia a través de transferencia horizontal de genes (Munita y Arias, 2016). Es por ello la importancia de la vigilancia molecular, que se encarga de identificar los genes que codifican la resistencia de las bacterias que pueden generar resistencia cruzada, afectando a otros antibióticos de la misma clase (OMS, 2011).

La adquisición de genes de resistencia se logra debido a la mutación de genes en el cromosoma, o la transferencia horizontal de genes (Aleksun y Levy, 2007; Avguštin, 2012), siendo este último el más importante en la resistencia antimicrobiana (Munita y Arias, 2016)

2.3.6 GENÉTICA DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *E. coli*

La alta distribución de la *E. coli* en el mundo en diferentes especies, como comensal en humanos y animales y agente patógeno, lo hace propenso a ser una de las bacterias con alta resistencia antimicrobiana (Lunha *et al.*, 2020), lo que es motivo de estudio en muchos países como indicador de resistencia antimicrobiana.

Muchos de los estudios demuestran la resistencia antimicrobiana a través de pruebas fenotípicas; sin embargo, las pruebas moleculares nos permiten conocer el determinante genético de resistencia antimicrobiana, que puede ser por mutaciones genéticas o adquisición a través de transferencia horizontal.

La alta frecuencia en resistencia antimicrobiana en cepas de *E. coli* se ha encontrado hasta en el 70% de cepas estudiadas por Brand *et al.* (2017), los cuales fueron resistentes a al menos un antibiótico; siendo el sulfametoxazol, trimetoprima y tetraciclina la combinación más frecuente.

La resistencia antimicrobiana no sólo se ha visto en aislados de *E. coli* de porcinos con signos clínicos de diarrea, sino también en aislados de porcinos sanos (Lim *et al.*, 2007). Estudios realizados por Boerlin *et al.* (2005), muestran una alta distribución de genes de resistencia en islotes de *E. coli* enterotoxigénicas (ETEC), siendo *tetA* (89%), *aadA* (89%) y *sull* (72%) los genes de mayor frecuencia, así como en islotes de *E. coli* provenientes de animales aparentemente sanos donde la frecuencia de distribución de genes fueron mayores en *aadA* (55%), *tetB* (46%) y *tetA* (32%); de la misma manera, Lim *et al.* (2007), encontraron resistencia antimicrobiana en cepas de *E. coli* proveniente de muestras fecales de porcinos sanos, la resistencia más frecuente en los porcinos fue de las tetraciclinas con un total de 96.3 %, seguida de estreptomicina, ampicilina y cloranfenicol, lo que aumenta la importancia de los estudios de los genes de resistencia, ya que la *E. coli*, a través de la transferencia horizontal, sirve como reservorios de genes para otras bacterias como *Salmonella typhimurium* y otros patógenos, así

como en el caso de los humanos al consumir alimentos contaminados de origen animal (Kikuvi *et al.*, 2007; Blake *et al.*, 2003), encontrándose incluso, mayor resistencia en la especie porcina que en otras especies en producción como el ganado vacuno (Lanz *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2007), donde la resistencia a las tetraciclinas en porcinos alcanza el 96% comparado al 30% en vacunos de Corea, donde las muestras fecales fueron recolectadas de animales sin signos clínicos (Lim *et al.*, 2007).

La transferencia horizontal de genes es la principal responsable de la resistencia antimicrobiana, asociándose a la diseminación de genes de resistencia ante antimicrobianos de uso frecuente (Munita y Arias, 2016), pues permite el intercambio directo de información genéticas entre bacterias, a través de diferentes mecanismos como: conjugación, transducción y transformación (Avguštin, 2012). Los humanos pueden ser colonizados por estas bacterias resistentes y a su vez transferir sus genes de resistencia a otras bacterias endógenas de la flora intestinal del hombre (Van den Bogaard y Stobberingh, 2000). Estudios realizados por Blake *et al.* (2003), confirmaron la transferencia de genes de resistencia de agentes patógenos a comensales, lo que aumenta la importancia del seguimiento de la resistencia antimicrobiana.

La transferencia de estos genes puede darse a través de plásmidos y transposones por mecanismos llamados conjugación; bacteriófagos, por transducción u otros elementos genéticos móviles como los integrones (Alekhun y Levy, 2007).

La transmisión mediada por plásmidos es el mecanismo más común de transferencia horizontal de genes entre bacterias Gram negativas, éstos contienen islas genómicas y son fuentes fáciles de determinantes de resistencia (Alekhun y Levy, 2007; Davies J. y Davies D., 2010), pudiendo incluso transferirse entre bacterias diferentes o no relacionadas (Avguštin, 2012).

Los transposones son fragmentos de ADN que pueden estar en plásmidos o integrarse a otros transposones o cromosoma del huésped, pudiendo incluso facilitar la transferencia de plásmidos endógenos de un organismo a otro (Alekhun y Levy, 2007).

Un bacteriófago es un virus bacteriano capaz de insertarse en el cromosoma del huésped, el ADN bacteriano puede quedar en una cápside del bacteriofago que es capaz de unirse a otra célula receptora e inyectar el ADN, esta transferencia de genes bacterianos por partículas virales se conoce como transferencia (Lerminiaux y Cameron, 2018).

Los integrones son elementos genéticos que contienen casetes genéticos, capaces de acoplarse a otros ADN y entregar nuevos genes en un solo intercambio. En su estructura se encuentra una integrasa, sitios de unión y elementos transcripcionales que impulsan la expresión de múltiples genes de resistencia (Alekhun y Levy, 2007; Mosquito *et al.*, 2011). Existen dos grupos de integrones, grupo I o integrones móviles (divididos en tres diferentes clases), asociado a casetes de resistencia antimicrobiana y grupo II o superintegrones, muy poco relacionado a la resistencia antimicrobiana (Mosquito *et al.*, 2011).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN Y PERIODO DE DURACIÓN

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, sección Bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos durante el mes de julio del 2020 a mayo del 2021.

3.2 MATERIAL EXPERIMENTAL

Equipos

- Microcentrífuga (Thermo Scientific).
- Termociclador Biometra TOne by Analytik Jena.
- Espectrofotómetro DeNovix DS-11FX
- Congeladora (-20°C).
- Incubadora.
- Estufa PRECISION Thelco (Rango de T° hasta 60°C).
- Cámara de electroforesis.
- Transiluminador SafeVIEW.
- Vórtex.
- Flujo laminar (DNA/RNA UV Cleaner Box - BIOSAN).
- Mechero.
- Ansas.
- Baño maría.
- Placas Petri de vidrio 100x15 mm.
- Micropipetas.

Material de laboratorio

- Agar MacConkey.
- Caldo de cultivo Tripticasa de Soya.
- Agarosa y agua molecular.
- Pipetas y tips.
- Microviales.
- Gradillas.
- Guantes descartables.
- Cepas de *Escherichia coli*.

Reactivos

- Kit comercial Genomic DNA Purification (Thermo Scientific).
- Taq polimerasa.
- dNTP
- Buffer
- Marcador de peso molecular Lambda DNA/HindIII Markers de la marca Promega.
- Cebadores o primers.

3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

3.3.1 TAMAÑO DE MUESTRA

Se utilizó un total de 119 aislados de *Escherichia coli* de cerdos con cuadros diarreicos, enviados al Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, sección Bacteriología de la FMV - UNMSM, remitidas por veterinarios y productores de granjas porcinas tecnificadas de Lima Metropolitana desde el 2017 hasta el 2020. Las bacterias fueron identificadas mediante

pruebas bioquímicas convencionales antes de su conservación, las cuales incluyen prueba de indol, agar hierro tres azúcares (TSI), utilización de citrato, prueba de ureasa y catalasa. Todos los aislados se encuentran debidamente conservados y registrados en el cepario.

3.3.2 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

3.3.2.1 REACTIVACIÓN DE LOS AISLADOS

Los aislados de *Escherichia coli* fueron conservados en caldo de cultivo Tripticasa de Soya (TSB) con glicerol al 20% en microviales a -20 °C. Las cepas de *E. coli* aisladas fueron inoculadas en caldo de Tripticasa de soya e incubadas a 37 °C por 24 horas, luego ese caldo fue sembrado en Agar MacConkey por agotamiento e incubado a 37 °C por 24 horas (Sánchez y Corrales, 2005).

3.3.2.2 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN

La extracción de ADN bacteriano se realizó siguiendo las recomendaciones del kit comercial *Genomic DNA Purification (Thermo Scientific)* (Anexo 1). El ADN extraído fue conservado a -20°C hasta su posterior utilización.

3.3.2.3 DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

Se realizó PCR convencional para la identificación de los genes de resistencia a los principales antibióticos y de mayor importancia en la industria porcina, tales como las tetraciclinas (*tetA*, *tetB* y *tetC*), sulfonamidas (*sul1*, *sul2* y *sul3*), estreptomicina-espectinomicina (*strA/strB*, *aadA*) y apramicina (*aac(3)IV*). Para ello se utilizaron diversos cebadores (Cuadro 1) y el protocolo descrito por Boerlin *et al.* (2005).

La solución para amplificación de genes tuvo un volumen total de 20 uL, el cual contiene 1 uL del ADN molde (muestra), 0.8 uL de cada primer (0.4 uM), 0.2 uL de taq Polimerasa, 2 uL de x buffer y 0.4 uL de dNTP (0.2mM).

Se usó el Termociclador Biometra Tone (Analytik Jena) para desarrollar todas las PCR convencionales tomando como base los ciclos de temperatura descritos por Boerlin *et al.* (2005): 1 ciclo de 4 min a 95 °C; 35 ciclos, cada uno de los cuales consta de 1 min a 95 °C para la desnaturalización, 1 min a temperatura para el alineamiento (Cuadro 1) y 1 min a 72 °C; y 1 ciclo de 7 min a 72 °C.

Se utilizaron como controles positivos aislados de *Escherichia coli* con secuenciamiento completo del genoma (Datos no publicados) (EC247K: *sul 3, tetA, tetB, strA, strB* y *aadA*; EC237K: *sul3, strA, strB, tetA, tetC*; EC204K: *aadA, tetA, BlaTeM, ant, mcr-1*). Como control negativo se usó a la cepa ATCC 25922 *Escherichia coli*. Se utilizó como control blanco agua ultrapura, para descartar contaminación de los reactivos usados en el PCR.

Cuadro 1. Cebadores utilizados para la detección de resistencia a antibióticos.

GEN	NOMBRE DEL CEBADOR	SECUENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS	AMPLICIÓN (pb)	ANNEALING (°C)	REFERENCIA
<i>aadA</i>	4F	GTGGATGGCGGCCTGAAGCC	525	68	Madsen <i>et al.</i> (2000)
	4R	AATGCCCAGTCGGCAGCG			
<i>strA</i>	2F	CCTGGTGATAACGGCAATTC	546	55	
	2R	CCAATCGCAGATAGAAGGC			
<i>strB</i>	3F	ATCGTCAAGGGATTGAAACC	509	55	

	3R	GGATCGTAGAACATATTGGC			
<i>tetA</i>	TetA-L	GGCGGTCTTCTTCATCATGC	502	64	Lanz <i>et al.</i> (2003)
	TetA-R	CGGCAGGCAGAGCAAGTAGA			
<i>tetB</i>	TetB-L	CATTAATAGGCGCATCGCTG	930	64	
	TetB-R	CATTAATAGGCGCATCGCTG			
<i>tetC</i>	TetC-L	GCTGTAGGCATAGGCTTGGT	888	64	
	TetC-R	GCCGGAAGCGAGAAGAATCA			
<i>sul1</i>	Sul1-L	GTGACGGTGTTCCGGCATTCT	779	68	
	Sul1-R	TCCGAGAAGGTGATTGCGCT			
<i>sul2</i>	Sul2-L	CGGCATCGTCAACATAACCT	721	66	
	Sul2-R	TGTGCGGATGAAGTCAGCTC			
<i>sul3</i>	Sul3-F	GAGCAAGATTTTTGGAATCG	880	51	Perreten y Boerlin (2003)
	Sul3-R	CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTTGGA			
<i>aac(3)IV</i>	Aac4-L	TGCTGGTCCACAGCTCCTTC	653	59	Boerlin <i>et al.</i> (2005)
	Aac4-R	CGGATGCAGGAAGATCAA			

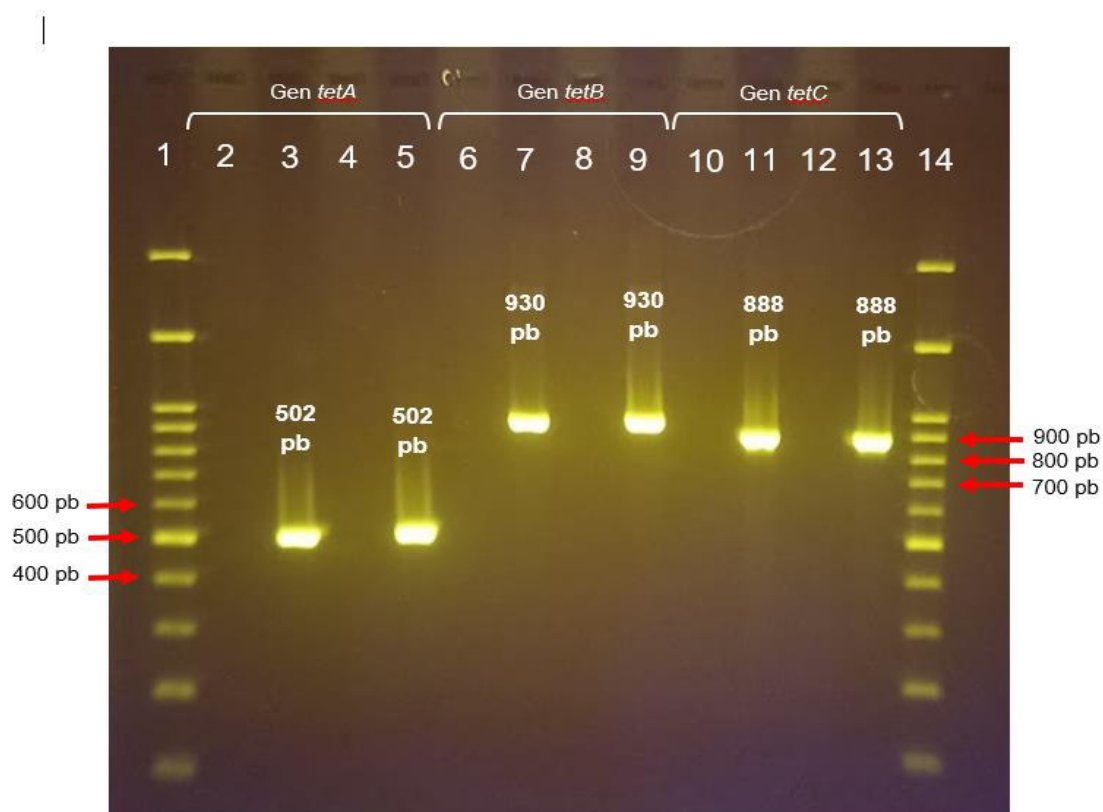
3.3.2.4 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Los ADN amplificados por PCR fueron identificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en solución tampón TBE al 0.5X durante 80 minutos a 90V y observados por el transiluminador de luz UV. Se usó como marcador de peso molecular Lambda DNA/HindIII Markers (Promega).

4. RESULTADOS

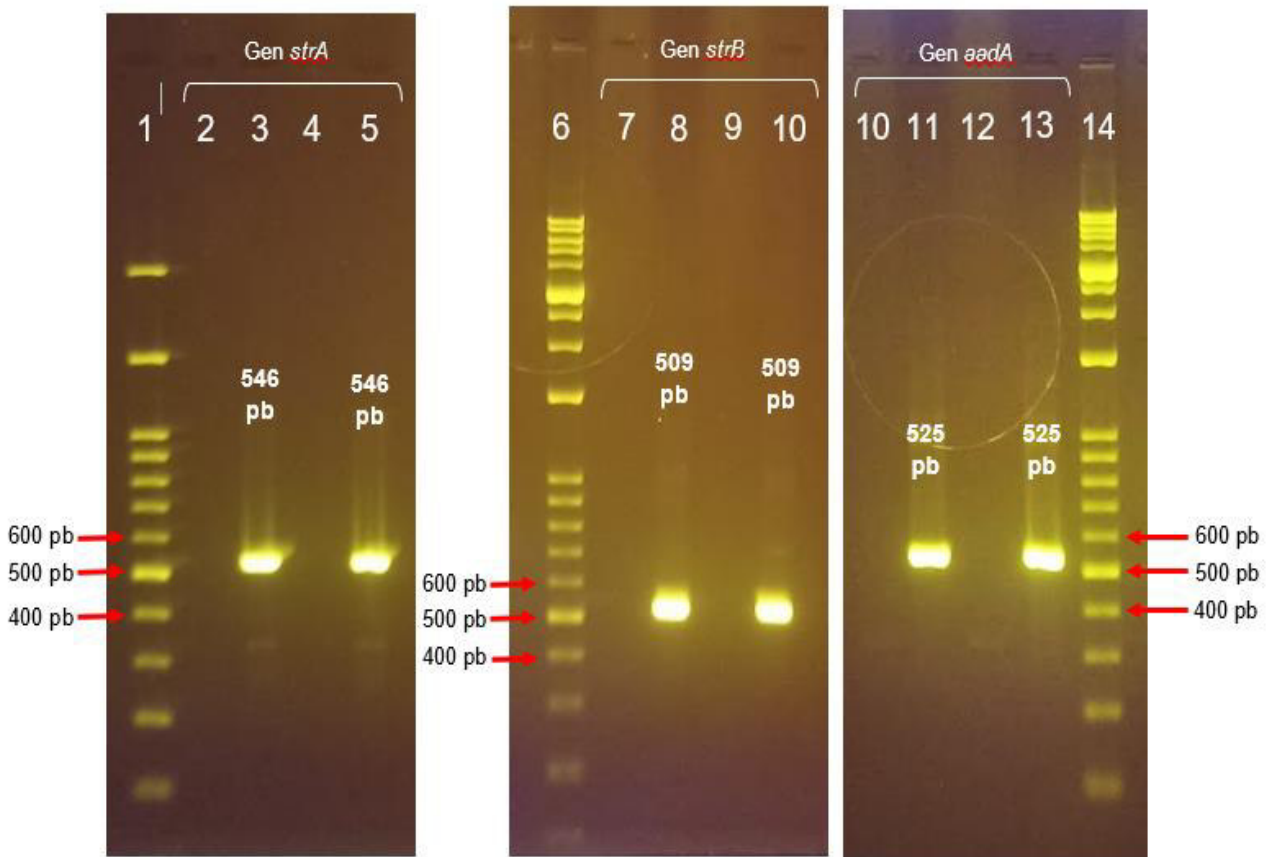
El estudio tuvo como objetivo detectar la presencia de genes de resistencia antimicrobiana de los principales antibióticos usados en la producción porcina, tales como las tetraciclinas (*tetA*, *tetB* y *tetC*) (**Figura 5**), estreptomicina-espectinomicina (*strA*, *strB* y *aadA*) (**Figura 6 y 8**) sulfonamidas (*sul1*, *sul2* y *sul3*) (**Figura 7 y 9**) y apramicina (*aac(3)IV*) (**Figura 7**) en cepas de *E. coli* mediante PCR convencional.

Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la ampliación del gen *tetA* (502 pb), *tetB* (930 pb) y *tetC* (888 pb).



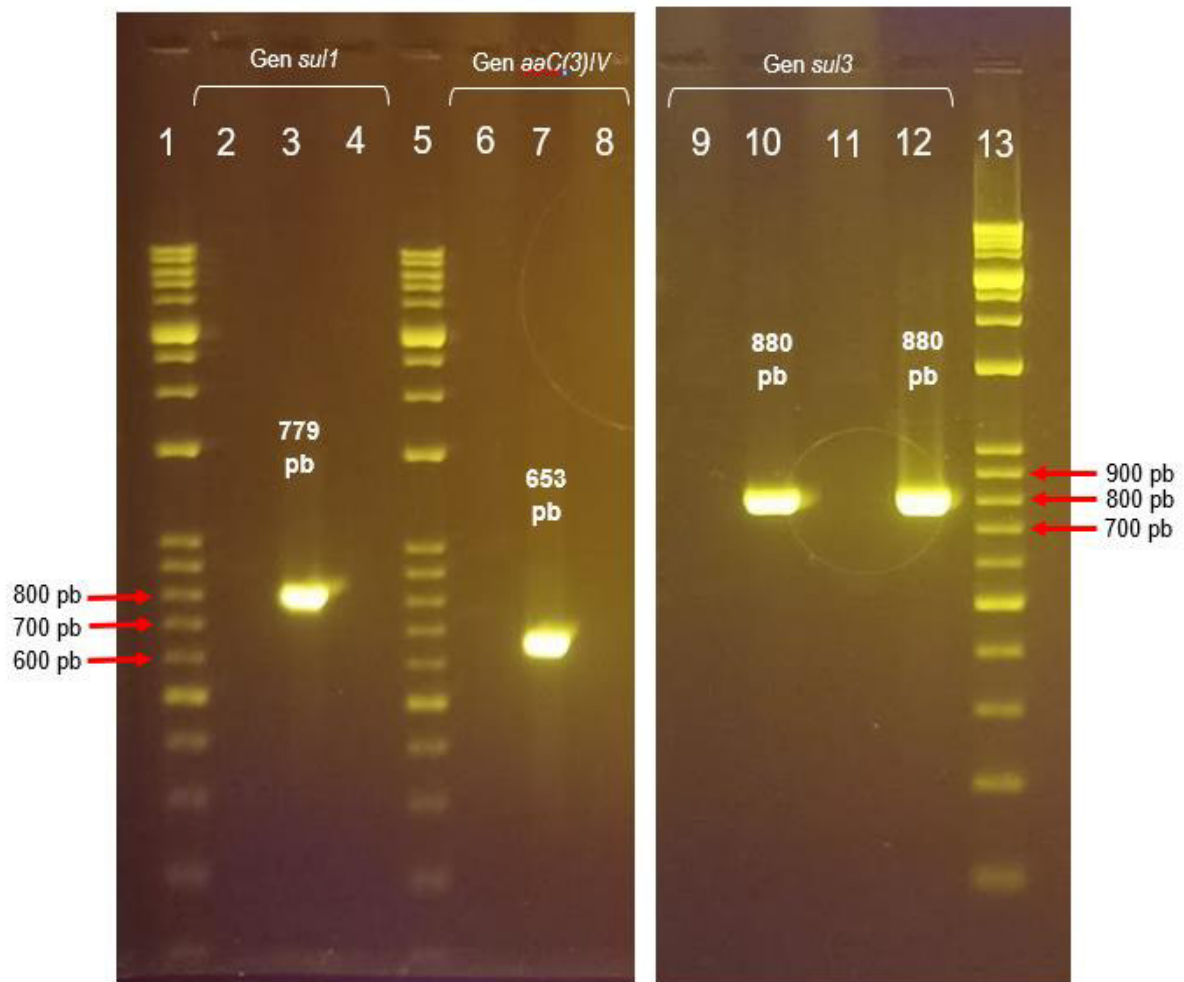
Carril 1 y 14: marcador de peso molecular de 100 pb, carril 2, 6 y 10: control blanco, carril 3 y 7: control positivo cepa EC247K, carril 11: control positivo cepa EC237K, carril 4, 8 y 12 control negativo cepa ATCC 25922 E. coli, carril 5: muestra positiva para el gen tetA, carril 9: muestra positiva para el gen tetB, carril 13: muestra positiva para el gen tetC.

Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la ampliación del gen *strA* (546 pb), *strB* (509 pb) y *aadA* (525 pb).



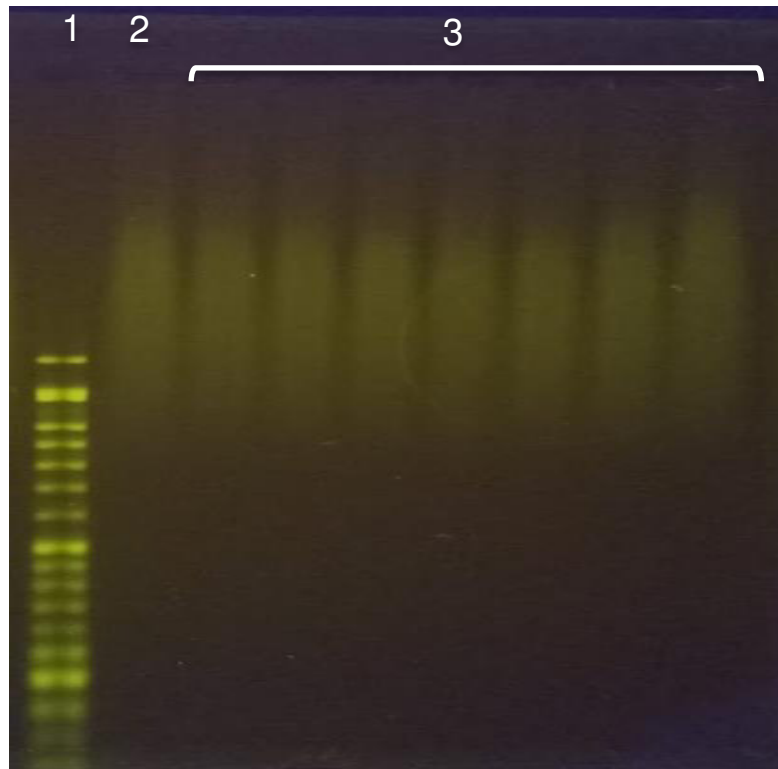
Carril 1, 6 y 14: marcador de peso molecular de 100 pb, carril 2, 7 y 10: control blanco, carril 3, 8 y 11: control positivo cepa EC247K, carril 4, 9 y 12: control negativo cepa ATCC 25922 E. coli, carril 5: muestra positiva para el gen strA, carril 10: muestra positiva para el gen strB, carril 13: muestra positiva para el gen aadA.

Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la ampliación del gen *sul1* (779 pb), *aaC(3)IV* (653 pb) y *Sul3* (880pb).



*Carril 1, 5 y 13: marcador de peso molecular de 100 pb, carril 2, 6 y 9: control blanco, carril 10: control positivo cepa EC247K, carril 4, 8 y 11: control negativo cepa ATCC 25922 E. coli, carril 3: muestra positiva para el gen *sul1*, carril 7: muestra positiva para el gen *aaC(3)IV*, carril 12: muestra positiva para el gen *sul3*.*

Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la ampliación del gen *Sul2* (721pb)



Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb, carril 2: control blanco, carril 3: muestras negativas para el gen sul2.

Del total de 119 cepas procesadas, el 98.3% (117/119) fueron positivas a al menos un gen de resistencia.

El antibiótico con la frecuencia más alta de resistencia fue del grupo de las tetraciclinas (88.2%), seguido de las sulfonamidas (65.5%), estreptomicina-espectinomicina (64.7%) y por último la apramicina (2.5%) (**Cuadro 2**).

Cuadro 2. Frecuencia de resistencia antimicrobiana a los diferentes grupos de antibióticos.

	ESTREPTOMICINA-ESPECTINOMICINA	SULFONAMIDAS	TETRACICLINA	APRAMICINA
N° DE CEPAS POSITIVAS / TOTAL	77/119	78/119	105/119	3/119
% DE CEPAS POSITIVOS	64.7	65.5	88.2	2.5

Se determinó la frecuencia de resistencia antimicrobiana a más de un antibiótico, considerando los 3 antibióticos con mayor resistencia: estreptomicina-espectinomicina (EST-EST), sulfonamidas (SUL), tetraciclinas (TET) y apramicina (APR). Se tomaron grupos combinados (**Cuadro 3**) donde la mayor frecuencia de resistencia a más de un antimicrobiano fue de sulfonamidas y tetraciclinas con un 59.6 % (71/119).

Cuadro 3. Frecuencia en la resistencia antimicrobiana a más de dos antibióticos.

	n POSITIVOS	%
EST-ESP+SUL	51	42.9
EST-ESP+TET	69	57.9
SUL+TET	71	59.6
EST-ESP+SUL+TET	48	40.3
SUL+TET+APR	1	0.8
EST-ESP+APR	1	0.8
EST-ESP+SUL+TET+APR	1	0.8

*EST-ESP: estreptomicina-espectinomicina, SUL: sulfonamidas, TET: tetraciclinas, APR: apramicina.

Del total de cepas procesadas, el 41.2 % (49/119) fueron consideradas multidrogo resistentes por ser resistencia a al menos 3 antibióticos. De estos, la cepa EC173K fue resistente a los cuatro grupos de antibióticos del estudio.

Fueron considerados 10 diferentes genes de resistencia antimicrobiana, de los cuales el gen *tetA* tuvo la frecuencia más con 68% (81/119), seguido del gen *sul3* con 64.7% (77/119), *strB* con un 42% (50/119), *aadA* con un 39.5% (47/119), *strA* con un 34.5% (41/119), *tetB* con un 31.9% (38/119), *aac(3)IV* con un 2.5% (3/119), *sul2* fue negativo para todas las cepas y el gen *tetC* y *sul1* con un 0.8% (1/119); sin embargo, el gen *sul1* no fue corroborado con el secuenciamiento completo del genoma; (**Cuadro 4**). De los 119 aislados, sólo uno presentó resistencia a 6 diferentes genes de resistencia antimicrobiana (*aadA*, *strA*, *strB*, *sul3*, *tetA* y *tetB*) y 2 de los aislados (1.7%) no presentó ninguno de los 10 genes de resistencia antimicrobiana evaluados.

Cuadro 4. Frecuencia de genes de resistencia antimicrobiana.

GENES DE RESISTENCIA	POSITIVOS	FRECUENCIA
	Nº/ TOTAL	%
<i>aadA</i> (4F)	47/119	39.5
<i>strA</i> (2F)	41/119	34.5
<i>strB</i> (3F)	50/119	42
<i>sul1</i>	1/119	0.8
<i>sul2</i>	0/119	0
<i>sul3</i>	77/119	64.7
<i>tetA</i>	81/119	68
<i>tetB</i>	38/119	31.9
<i>tetC</i>	1/119	0.8
<i>aac(3)IV</i>	3/119	2.5

La mayor frecuencia a dos genes de resistencia antimicrobiana se vio entre *tetA* y *sul3* con un 46.2% (55/119), seguido de los genes *strA* y *strB*, ambos pertenecientes al grupo de antibióticos estreptomicina-espectinomicina, con un 34.5% (41/119); *sul3* con *aadA* con un 29.4% (35/119), *tetA* con *strB* con un 28.6 % (34/119), *tetA* con *strA* y *tetA* con *aadA*, ambos con un 27.3 % (33/119) (**Cuadro 5**).

Cuadro 5. Frecuencia a dos de genes de resistencia antimicrobiana.

	<i>aadA (4F)</i>	<i>strA(2F)</i>	<i>StrB(3F)</i>	<i>Sul1</i>	<i>Sul3</i>	<i>TetA</i>	<i>TetB</i>	<i>TetC</i>	<i>aac(3)IV</i>
<i>aadA (4F)</i>	-	16 (13.4)	18 (15.1)	0	35 (29.4)	33 (27.3)	12 (10)	0	1 (0.8)
<i>strA(2F)</i>	16 (13.4)	-	41 (34.5)	0	22 (18.5)	33 (27.3)	16 (13.4)	1 (0.8)	1 (0.8)
<i>StrB(3F)</i>	18 (15.1)	41 (34.5)	-	1 (0.8)	29 (24.4)	34 (28.6)	16 (13.4)	1 (0.8)	2 (1.7)
<i>Sul1</i>	0	0	1 (0.8)	-	0	0	0	0	0
<i>Sul3</i>	35 (29.4)	22 (18.5)	29 (24.4)	0	-	55 (46.2)	27 (22.7)	1 (0.8)	2 (1.7)
<i>TetA</i>	33 (27.3)	33 (27.3)	34 (28.6)	0	55 (46.2)	-	13 (10.9)	1 (0.8)	1 (0.8)
<i>TetB</i>	12 (10)	16 (13.4)	16 (13.4)	0	27 (22.7)	13 (10.9)	-	0	1 (0.8)
<i>TetC</i>	0	1 (0.8)	1 (0.8)	0	1 (0.8)	1 (0.8)	0	-	0
<i>aac(3)IV</i>	1 (0.8)	1 (0.8)	2 (1.7)	0	2 (1.7)	1 (0.8)	1 (0.8)	0	-

5. DISCUSIÓN

El protocolo usado para la identificación de genes de resistencia antimicrobiana fue usado previamente por diversos estudios de determinación de resistencia antimicrobiana en diferentes países (Lanz *et al.*, 2003; Schwaiger *et al.*, 2010; Sheikh *et al.*, 2012; Mazurek *et al.*, 2018) aplicado a diferentes especies animales y carnes de producción, de los cuales, el realizado por Boerlin *et al.* (2005), fue usado como base para la realización de este estudio.

La resistencia antimicrobiana en aislados de *E. coli* provenientes de cerdos presentan altos porcentajes de frecuencia, alcanzado incluso el 100% de resistencia en cepas de ETEC (Boerlin *et al.*, 2005). De la misma manera, estudios que abarcan distintas especies de animales, concluyen que los porcinos presentan mayor frecuencia en la resistencia antimicrobiana (Lanz *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2007). En el Perú, Saldarriaga *et al.* (2000), encontraron que el 97% de las 340 aislados de *E. coli* presentaban resistencia por lo menos a un antibiótico. De la misma manera, Monterroso *et al.* (2019) encontró el 100% (36/36) de resistencia a por lo menos un antibiótico en aislados de *E. coli*. Ambos trabajos muestran resultados similares a este estudio, pues un 98.3% (117/119) fue resistente a por lo menos un antibiótico; esto refleja la alta prevalencia de resistencia antimicrobiana en nuestro medio a distintos antimicrobianos en la producción porcina. Esto puede deberse a la poca información e inexistencia de planes integrales y multisectoriales contra la resistencia antimicrobiana en nuestro país, que, a pesar de contar con un Plan Nacional para enfrentar la resistencia a los antimicrobianos, no existen políticas claras sobre el uso de antimicrobianos en animales de producción.

En este estudio, las cepas de *E. coli* presentaron mayor resistencia contra las tetraciclinas (88.2%), seguido de las sulfonamidas (65.5%), estreptomicina-espectinomicina (64.7%), y por último la apramicina (2.5%). Esta alta resistencia contra las tetraciclinas, que es el antimicrobiano con mayor frecuencia, también ha sido descrita por Boerlin *et al.* (2005), en cuyo estudio alcanzó un 100% de frecuencia en cepas ETEC; de la misma manera, Lim *et al.*

(2007) encontraron que el 96.3% de aislados de *E. coli* de cerdos de Corea aparentemente sanos fueron resistentes a las tetraciclinas. Las tetraciclinas es el antibiótico de elección para el tratamiento y prevención de enfermedades, además de usarse como promotor de crecimiento en porcinos durante muchos años, provocando altos niveles de resistencia antimicrobiana, incluso encontrándose en animales salvajes que tienen contacto con granjas de cerdos, esto debido a la existencia de elementos genéticos móviles que facilitan la transferencia de estos genes de resistencia (Kozak *et al.*, 2008). Sin embargo, Mazurek *et al.* (2018), presentaron una mayor frecuencia de resistencia antimicrobiana contra las sulfonamidas, esto puede deberse a que las muestras utilizadas eran provenientes de lechones que fueron alimentados con pienso medicado con sulfonamidas y otros antibióticos previos a un diagnóstico de colibacilosis.

En aminoglucósidos, la estreptomina-espectinomicina pertenece dentro del grupo con mayor resistencia antimicrobiana (64.7%) junto con las tetraciclinas y sulfonamidas al igual que diferentes autores, donde se encontró que el 37% (47/126) (Lanz *et al.*, 2003), 66.8% (274/410) (Lim *et al.*, 2007) y 48% (38/125) (Kozak *et al.*, 2008) de aislados provenientes de cerdos fueron resistentes a la estreptomina, siendo el tercer antimicrobiano con mayor frecuencia de resistencia; sin embargo, una alta resistencia de este antimicrobiano fue reportado por Saldarriaga *et al.* (2000) en el Perú, alcanzando un 86% de resistencia fenotípica. La diferencia entre la frecuencia de resistencia de diferentes antimicrobianos puede deberse a los distintos planes de tratamiento y suplementación alimentaria con antibióticos en los diferentes países evaluados.

Con respecto a los genes de resistencia, *tetA* fue el de mayor frecuencia al igual que los resultados de Boerlin *et al.* (2005), donde no solo es el gen predominante en el grupo de las tetraciclinas, pues presenta un 92% de frecuencia entre todos los genes de resistencia antimicrobiana evaluados, lo cual concuerda con los resultados de otros estudios (Lanz *et al.*, 2003; Schwaiger *et al.*, 2010; Sheikh *et al.*, 2012). Sin embargo, Maynard *et al.* (2003),

encontraron una baja frecuencia del gen *tetA* (25%) comparado con el gen *tetB* (80%) en muestras recolectadas desde 1978 al 2000, donde las frecuencias de genes de resistencia antimicrobiana fueron aumentando al paso de los años; estudios más antiguos posicionan el gen *tetB* y *tetC* como predominantes en la resistencia contra tetraciclinas (Sunde *et al.*, 1998), inclusive predominando el gen *tetC* en porcinos sin exposición a antimicrobianos, el cual fue el de menor frecuencia en este estudio. Esto puede deberse al modo de acción de los distintos genes de resistencia, que contribuye a una selección positiva y formación de nuevos genes de resistencia, así como los diferentes usos de antimicrobianos a lo largo del tiempo.

El segundo gen de resistencia antimicrobiana con mayor frecuencia fue *sul3* (64.7%), a comparación de distintos estudios donde el predominante en las sulfonamidas corresponde al gen *sul1* (Boerlin *et al.*, 2005; Brand *et al.*, 2017; Mazurek *et al.*, 2018); sin embargo, Sheikh *et al.* (2012), obtuvieron la misma frecuencia de resistencia en los genes *sul1* y *sul3* (9.8%) en muestras procedentes de carne de cerdo. Otros autores (Lanz *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2010) no consideraron el gen *sul3* en sus estudios, siendo el gen *sul1* el predominante. Esto puede deberse, para ese entonces, al reciente descubrimiento del gen *sul3* en la población porcina de Suiza por Perrenten y Boerlin en el 2003, demostrando la capacidad de adaptación bacteriana contra la resistencia antimicrobiana. Por otro lado, en este estudio el gen *sul2* no fue encontrado en ninguna cepa, mientras que los resultados planteados por Schwaiger *et al.* (2010), el gen *sul2* fue predominante en el grupo de las sulfonamidas y el gen *sul3* el de menor frecuencia; esto puede deberse a la diferencia geográfica y al uso de distintos antibióticos.

Los genes *strB*, seguido del gen *aadA*, fueron los de mayor frecuencia del grupo de las estreptomicina-espectinomicina, estos resultados difieren con varios autores, donde el gen *aadA* es el más frecuente dentro del grupo de los aminoglucósidos en porcinos (Lanz *et al.*, 2003; Boerlin *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2010; Sheikh *et al.*, 2012; Mazurek *et al.*, 2018). Este grupo de antimicrobianos también evaluado en Perú por Saldarriaga *et al.* (2000), donde la

resistencia fenotípica más alta fue hacia la estreptomicina a pesar de no tener registros del uso de estreptomicina en marranas y lechones del estudio, pero con sospechas de transmisión a través de las marranas de reemplazo; además, el uso constante de este antimicrobiano forma resistencia de hasta 40 000 veces más que su sensibilidad anterior (Litter, 1992)

El gen *aac(3)IV* fue el de menor frecuencia, encontrándose solo en 3 de las cepas, lo que concuerda con distintos estudios (Kozac *et al.*, 2008; Sheikh *et al.*, 2012) donde la frecuencia de este gen de resistencia fue mínima. Sin embargo, este gen es notablemente mayor en los resultados de Smith *et al.* (2010), siendo el segundo gen con más frecuencia en el grupo de aminoglucósidos, alcanzando incluso el 85% de aislamientos positivos, esto puede deberse a la característica de las cepas usadas, pues los serogrupos en el estudio corresponden al patotipo ETEC y son multidrogo resistentes.

La frecuencia de resistencia a más de dos antimicrobianos fue mayor entre *tetA* y *sul3*, dado que ambos fueron los genes con mayor presencia en este estudio, pues otros autores no muestran asociación entre estos (Boerlin *et al.*, 2005; Schwaiger *et al.*, 2010; Sheikh *et al.*, 2012), probablemente por la poca frecuencia del gen *sul3* en sus resultados. La segunda asociación más frecuente fue de los genes *strA* y *strB*, ambos pertenecientes al grupo de los aminoglucósidos; esta misma combinación se ha visto presente en varios estudios (Boerlin *et al.*, 2005; Schwaiger *et al.*, 2010; Zhao y Dang, 2010), puesto que la interacción de ambos genes garantiza una mayor resistencia contra la estreptomicina (Sunde y Norström, 2005). Por otro lado, la combinación de dos genes de resistencia contra las tetraciclinas fue mínima, al igual que Schwaiger *et al.* (2010), donde el 9% de los aislados presentaban dos genes de resistencia contra las tetraciclinas, lo que podría deberse a una incompatibilidad de plásmidos que contienen genes de resistencia contra las tetraciclinas (Jones *et al.*, 1992; Maynard *et al.*, 2003).

La presencia de varios de genes de resistencia antimicrobiana en una misma cepa se debe a los plásmidos, transposones e integrones que facilitan la transferencia de genes hacia otras

bacterias (Alekschum y Levy, 2007; Davies J. y Davies D., 2010), creando así un reservorio de genes capaces de diseminar la resistencia antimicrobiana.

La técnica de PCR para la identificación de fragmentos de ADN deseados puede mostrarnos productos inespecíficos en la electroforesis, encontrados en los resultados de este estudio. Esto debido a la capacidad de la *taq* polimerasa de sintetizar fragmentos inespecíficos, así como las concentraciones de cloruro de magnesio que pueden inhibir a la polimerasa por concentraciones altas o formar productos inespecíficos por concentraciones bajas. El uso de cantidades altas de primers aumentan el rendimiento del PCR, pero también forman productos inespecíficos, a diferencia de usar una baja cantidad de primers, que puede ayudar a ser más específico los productos del PCR pero de bajo rendimiento (Espinosa, 2007). Los primers también pueden unirse a otras secuencias similares de otros genes inespecíficos. Así, en los resultados encontramos algunos productos inespecíficos (PI). Sin embargo, estos se consideran como muestras negativas, pues el producto que amplifican son tanto menores o mayores a los productos específicos.

Estos resultados demuestran la alta presencia de resistencia antimicrobiana en nuestro medio en porcinos de producción con signos diarreicos y la importancia del seguimiento y control del tema por parte de las autoridades sanitarias correspondientes.

6. CONCLUSIONES

- Se determinó una alta resistencia antimicrobiana (98.3%) en aislados de *E. coli* de cuadros diarreicos de cerdos.
- Se determinó una alta frecuencia de genes de resistencia, siendo los genes *tetA* (68%), *sul3* (64.7%), *strB* (42%) y *aadA* (39.5%) los de mayor frecuencia.
- La frecuencia más alta de resistencia antimicrobiana fue al grupo de las tetraciclinas (88.2%), seguido de las sulfonamidas (65.5%), estreptomicina-espectinomicina (64.7%) y por último la apramicina (2.5%).
- El 41.2% de los aislados son multidrogo resistentes, siendo la combinación más frecuente entre las tetraciclinas, sulfonamidas y estreptomicina-espectinomicina.

7. LITERATURA CITADA

1. **Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. 2014.** Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry* 53: 1565-1574. doi:10.1021/bi5000564
2. **Alekshun MN, Levy SB. 2007.** Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* 128: 1037-1050. doi:10.1016/j.cell.2007.03.004
3. **Avguštin J. 2012.** Animal production systems as a selective environment for antibiotic resistance genes. *Acta Agric Slov* 100: 7-17. doi:10.2478/v10014-012-0008-1
4. **Belotserkovsky I, Sansonetti PJ. 2018.** Shigella and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Curr Top Microbiol Immunol*. doi:10.1007/82_2018_104
5. **Blake DP, Hillman K, Fenlon DR, Low JC. 2003.** Transfer of antibiotic resistance between commensal and pathogenic members of the Enterobacteriaceae under ileal conditions. *J Appl Microbiol* 95: 428-436. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01988.x
6. **Boerlin P, Travis R, Gyles CL, Reid-Smith R, Heather Lim NJ, Nicholson V, McEwen S, Friendship R, Archambault M. 2005.** Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. *Appl Environ Microbiol* 71: 6753-6761. doi:10.1128/aem.71.11.6753-6761.2005
7. **Brand P, Gobeli S, Perreten V. 2017.** Pathotyping and antibiotic resistance of porcine enterovirulent *Escherichia coli* strains from Switzerland (2014-2015). *Schweiz Arch Tierheilkd* 159: 373-380. doi:10.17236/sat00120
8. **Bouguéneq C, Servin AL. 2006.** Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. *FEMS Microbiol Lett* 256: 185-194. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00144.x
9. **Burow E, Simoneit C, Tenhagen BA, Käsbohrer A. 2014.** Oral antimicrobials increase antimicrobial resistance in porcine *E. coli* – A systematic review. *Prev Vet Med* 113: 364-375. doi:10.1016/j.prevetmed.2013.12.007

10. **Casanova NA, Redondo LM, Dailoff GC, Arenas D, Fernández Miyakawa ME. 2018.** Overview of the role of Shiga toxins in porcine edema disease pathogenesis. *Toxicon* 148: 149-154. doi:10.1016/j.toxicon.2018.04.019
11. **Chopra I, Roberts M. 2001.** Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 65: 232-260. doi:10.1128/mmbr.65.2.232-260.2001
12. **Clugston RE, Nielsen NO, Smith DLT. 1974.** Experimental edema disease of swine (*E. coli* enterotoxemia) III. Pathology and pathogenesis. *Can J Com Med* 38: 34-43.
13. **Davies J, Davies D. 2010.** Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 74: 417-433. doi:10.1128/mmbr.00016-10
14. **Doi Y, Wachino J, Arakawa Y. 2016.** Aminoglycoside resistance. *Infect Dis Clin North Am* 30: 523-537. doi:10.1016/j.idc.2016.02.011
15. **Espinosa AL. 2007.** Guía práctica sobre la técnica de PCR. E.Eguiarte and X. Aguirre (Eds.) *Ecología molecular*. Instituto Nacional de Ecología, México. p. 517–540
16. **Fairbrother JM, Nadeau É, Gyles CL. 2005.** *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Res Rev* 6: 17-39. doi:10.1079/ahr2005105
17. **Fairbrother JM, Nadeau É, Bélanger L, Tremblay C-L, Tremblay D, Brunelle M, Wolf R, Hellman K, Hidalgo Á. 2017.** Immunogenicity and protective efficacy of a single-dose live non-pathogenic *Escherichia coli* oral vaccine against F4-positive enterotoxigenic *Escherichia coli* challenge in pigs. *Vaccine*, 35: 353–360. doi:10.1016/j.vaccine.2016.11.045
18. **Farfán-García AE, Ariza-Rojas SC, Vargas-Cárdenas FA, Vargas-Remolina LV. 2016.** Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Rev Chilena Infect* 33: 438–450. doi:10.4067/s0716-10182016000400009
19. **FDA (U.S. Food and Drug Administration). 2009.** Summary Report on Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals. [Internet], [15 agosto 2021]. Disponible en: <https://www.fda.gov/media/133411/download>

20. **Gomes TAT, Elias WP, Scaletsky ICA, Guth BEC, Rodrigues JF, Piazza RMF, Ferreira LCS, Martínez MB. 2016.** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Braz J Microbiol* 47: 3–30. doi:10.1016/j.bjm.2016.10.015
21. **Hebbelstrup Jensen B, Olsen KEP, Struve C, Krogfelt KA, Petersen AM. 2014.** Epidemiology and clinical manifestations of Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 27: 614–630. doi:10.1128/cmr.00112-13
22. **Hooper DC, Jacoby GA. 2015.** Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann N Y Acad Sci* 1354: 12–31. doi:10.1111/nyas.12830
23. **Jana S, Deb JK. 2006.** Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* 70: 140–150. doi:10.1007/s00253-005-0279-0
24. **Jones CS, Osborne DJ, Stanley J. 1992.** Enterobacterial tetracycline resistance in relation to plasmid incompatibility. *Mol Cell Prob* 6: 313–317. doi:10.1016/0890-8508(92)90007-k
25. **Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. 2004.** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2: 123–140. doi: 10.1038/nrmicro818
26. **Kiers JL, Meijer JC, Nout MJR, Rombouts FM, Nabuurs MJA., van der Meulen J. 2003.** Effect of fermented soya beans on diarrhoea and feed efficiency in weaned piglets. *J Appl Microbiol* 95: 545–552. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02011.x
27. **Kikvi SK, Lee HS, Nam HM, Cho YS, Kim JM, Song SW, Park YH, et al. 2007.** Antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* strains isolated from fecal samples of cattle and pigs in Korea during 2003-2004. *Int J Food Microbiol* 116: 283-286. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.014
28. **Kozak GK, Boerlin P, Janecko N, Reid-Smith RJ, Jardine C. 2008.** Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Swine and Wild Small Mammals in the Proximity of Swine Farms and in Natural Environments in Ontario, Canada. *Appl Environ Microbiol* 75: 559–566. doi:10.1128/aem.01821-08

29. **Lanz R, Kuhnert P, Boerlin P. 2003.** Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Vet Microbiol* 91: 73–84. doi:10.1016/s0378-1135(02)00263-8
30. **Lazo L, Dahbi G, Blanco M, Blanco JE, Blanco J, Llorens F. 2009.** Aplicación de técnicas moleculares en la caracterización de aislados de *Escherichia coli* procedentes de cerdos con síndrome diarreico en la provincia de Villa Clara. *Rev Salud Anim* 31: 93-104.
31. **Lerminiaux NA, Cameron ADS. 2018.** Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Can J Microbiol* 65: 34-44. doi:10.1139/cjm-2018-0275
32. **Lim SK, Lee HS, Nam HM, Cho YS, Kim JM, Song SW, Park YH, Jung SC. 2007.** Antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* strains isolated from fecal samples of cattle and pig in Korea during 2003-2004. *Int J Food Microbiol* 116: 283-286. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.014
33. **Litter, M. 1992.** Compendio de farmacología. IV Ed. Edit. El Ateneo. Buenos Aires.681-683 p.
34. **Lopardo HA, Predari S, Vay C. 2016.** Manual de microbiología clínica de la Asociación Argentina de Microbiología: enterobacterias. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología. 1a ed. p. 4-55.
35. **López-Álvarez. 2010.** *Escherichia coli*: Mecanismos de patogenicidad. Departamento de bacteriología Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. 39p.
36. **Lunha K, Leangapichart T, Jiwakanon J, Angkititrakul S, Sunde M, Järhult JD, Hallenberg GS, Hickman RA, Van Boeckel T, Magnusson U. 2020.** Antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* from humans and pigs at farms at different levels of intensification. *Antibiotics* 9: 662. doi:10.3390/antibiotics9100662
37. **Luppi A. 2017.** Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance. *Porcine Health Manag* 3:16. doi:10.1186/s40813-017-0063-4

38. **Madec F, Bridoux N, Bounaix S, Jestin A. 1998.** Measurement of digestive disorders in the piglet at weaning and related risk factors. *Prev Vet Med* 35: 53-72.
doi:10.1016/s0167-5877(97)00057-3
39. **Madsen L, Aarestrup FM and Olsen JE. 2000.** Characterization of streptomycin resistance determinants in Danish isolates of *Salmonella typhimurium*. *Vet Microbiol* 75:73. doi:10.1016/S0378-1135(00)00207-8
40. **Malik A, Tóth I, Nagy B. 2012.** Colonisation of conventional weaned pigs by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and its hazard potential for human health. *Acta Vet Hung* 60: 297-307. doi:10.1556/avet.2012.025
41. **Malik A, Nagy B, Kugler R, Szmolka A. 2017.** Pathogenic potential and virulence genotypes of intestinal and faecal isolates of porcine post-weaning enteropathogenic *Escherichia coli*. *Res Vet Sci* 115: 102-108. doi:10.1016/j.rvsc.2017.02.002
42. **Matise I, Sirinarumitr T, Bosworth BT, Moon, HW. 2000.** Vascular ultrastructure and DNA fragmentation in swine infected with Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Vet Pathol* 37: 318-327. doi:10.1354/vp.37-4-318
43. **Maynard C, Fairbrother JM, Bekal S, Sanschagrin F, Levesque RC, Brousseau R, Masson L, Larivière S, Harel, J. 2003.** Antimicrobial resistance genes in Enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 3214-3221.
doi:10.1128/AAC.47.10.3214-3221.2003
44. **Mazurek J, Bok E, Baldy-Chudzik K. 2018.** Complexity of antibiotic resistance in commensal *Escherichia coli* derived from pigs from an intensive-production farm. *Microbes Environ.* doi:10.1264/jsme2.me17041
45. **Meza-Segura M, Zaidi MB, Vera-Ponce de León A, Moran-García N, Martínez-Romero E, Nataro JP, Estrada-García T. 2020.** New insights into DAEC and EAEC pathogenesis and phylogeny. *Front Cell and Infect Microbiol* 10: 572951.
doi:10.3389/fcimb.2020.572951

46. **Monterroso M., Salvatierra G., Sedano A., Calle S. 2019.** Detección fenotípica de mecanismos de resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* aisladas de infecciones entéricas de porcinos provenientes de granjas de producción tecnificada. *Rev Inv Vet Perú* 30: 455-464. doi:10.15381/rivep.v30i1.15670
47. **Mosquito S, Ruiz J, Bauer JL, Ochoa TJ. 2011.** Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 28: 648-656. doi:10.17843/rpmesp.2011.284.430
48. **Munita JM, Arias CA. 2016.** Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol Spectr* 4: 4-2. doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015
49. **Nagy B, Fekete PZ. 2005.** Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol* 295: 443-454. doi:10.1016/j.ijmm.2005.07.003
50. **Nataro JP, Kaper JB, Robins-Browne R, Prad, V, Vial P, Levine MM. 1987.** Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr Infect Dis J* 6: 829–831. doi:10.1097/00006454-198709000-00008
51. **Navarro-García F, Elias WP. 2011.** Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E. coli*. *Gut Microbes* 2: 13-24. doi:10.4161/gmic.2.1.14933
52. **Ochoa TJ, Contreras CA. 2011.** Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children. *Curr Opin Infect Dis* 24: 478-483. doi:10.1097/qco.0b013e32834a8b8b
53. **[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2001.** Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. Ginebra: OMS. [Internet], [29 agosto 2021]. Disponible en:
http://www.antibioticos.mscbs.gob.es/PDF/resist_OMS_estrategia_mundial_contra_resistencias.pdf
54. **Öztürk H, Ozkirimli E, Özgür A. 2015.** Classification of beta-lactamases and penicillin binding proteins using Ligand-Centric network models. *PLoS One* 10: e0117874. doi:10.1371/journal.pone.0117874

55. **Pagès J-M, James CE, Winterhalter M. 2008.** The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* 6: 893–903. doi:10.1038/nrmicro1994
56. **Park JY. 2009.** Aminoglycoside resistance in Gram-negative Bacill. *Korean J Clin Microbiol* 12: 57-61. doi:10.5145/kjcm.2009.12.2.57
57. **Perreten V, Boerlin P. 2003.** A new sulfonamide resistance Gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 1169-1172. doi:10.1128/aac.47.3.1169-1172.2003
58. **Perfumo C, Quiroga M, Machuca M. 2019.** Compendio de clínica y sanidad de los cerdos: de la granja al laboratorio. 1ra ed. Argentina: Edulp. p 89-120.
59. **Quiles S y Hevia ML. 2008.** Colibacilosis porcina. *Prod Anim* 23: 6-17.
60. **Rhouma M, Fairbrother JM, Beaudry F, Letellier A. 2017.** Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. *Acta Vet Scand* 59: 31. doi:10.1186/s13028-017-0299-7
61. **Rodríguez C. 2014.** Estudio de un brote de colibacilosis entérica al destete en una granja de cerdos. Monografía Ingeniero Zootecnista. Lima: Univ Nac Agraria La Molina. 26 p.
62. **Roselli M, Finamore A, Garaguso I, Britti MS, Mengheri E. 2003.** Zinc oxide protects cultured enterocytes from the damage induced by *Escherichia coli*. *J Nut* 133: 4077-4082. doi:10.1093/jn/133.12.4077
63. **Saldarriaga TF, Calle ES, Camacho SC. 2000.** Resistencia antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* provenientes de lechones lactantes criados en una granja tecnificada de Lima. *Rev Inv Vet Perú* 11: 93-98. doi:10.15381/rivep.v11i2.7066
64. **Sánchez LC, Corrales LC. 2005.** Congelación Bacteriana: Factores que intervienen en el proceso. *NOVA* 3: 109-113. doi:10.22490/24629448.23

65. **Schwaiger K, Hölzel C, Bauer J. 2010.** Resistance gene patterns of tetracycline resistant *Escherichia coli* of human and porcine origin. *Vet Microbiol* 142: 329-336. doi:10.1016/j.vetmic.2009.09.066
66. **Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A. 2004.** Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol Rev* 28: 519-542. doi:10.1016/j.femsre.2004.04.001
67. **Servin AL. 2014.** Pathogenesis of human diffusely adhering *Escherichia coli* expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): Current insights and future challenges. *ClinMicrobiol Rev* 27: 823-869. doi:10.1128/cmr.00036-14
68. **Sheikh AA, Checkley S, Avery B, Chalmers G, Bohaychuk V, Boerlin P, Smith R, Aslam, M. 2012.** Antimicrobial resistance and resistance genes in *Escherichia coli* isolated from retail meat purchased in Alberta, Canada. *Foodborne Pathog Dis* 9: 625-631. doi:10.1089/fpd.2011.1078
69. **Sköld O. 2000.** Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resist Updat* 3: 155-160. doi:10.1054/drup.2000.0146
70. **Slinger R, Lau K, Slinger M, Moldovan I, Chan F. 2017.** Higher atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (a-EPEC) bacterial loads in children with diarrhea are associated with PCR detection of the EHEC factor for adherence 1/lymphocyte inhibitory factor A (*efa1/lifa*) gene. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 16: 16. doi:10.1186/s12941-017-0188-y
71. **Smith MG, Jordan D, Chapman TA, Chin JJC, Barton MD, Do TN, Fahy VA, Fairbrother JM, Trott DJ. 2010.** Antimicrobial resistance and virulence gene profiles in multi-drug resistant enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea. *Veterinary Microbiology*, 145: 299-307. doi:10.1016/j.vetmic.2010.04.004
72. **Sunde M, Fossum K, Solberg A, Sorum H. 1998.** Antibiotic resistance in *Escherichia coli* of the normal intestinal flora of swine. *Microb Drug Resist* 4: 289-299. doi:10.1089/mdr.1998.4.289

73. **Sunde M, Norström M. 2005.** The genetic background for streptomycin resistance in *Escherichia coli* influences the distribution of MICs. *J Antimicrob Chemoth* 56: 87-90. doi:10.1093/jac/dki150
74. **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: 567–573. doi:10.1089/mdr.2011.0068
75. **Szmolka A, Nagy B. 2013.** Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. *Front Microbiol*, 4: 258. doi:10.3389/fmicb.2013.00258
76. **Trabulsi LR, Keller R, Gomes TAT. 2002.** Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 8: 508-513. doi:10.3201/eid0805.010385
77. **Van den Broeck W, Cox E, Oudega B, Goddeeris BM. 2000.** The F4 fimbrial antigen of *Escherichia coli* and its receptors. *Vet Microbiol* 71: 223-244. doi:10.1016/s0378-1135(99)00174-1
78. **Van den Bogaard AE, Stobberingh EE. 2000.** Epidemiology of resistance to antibiotics Links between animals and humans. *Int J Antimicrob Agents* 14: 327-335. doi:10.1016/s0924-8579(00)00145-x
79. **Turcás VM, Pérez PE, Sotto AV. 2012.** Prevención de la Colibacilosis en crías porcinas utilizando diferentes tecnologías de crianza. *REDVET* 13: 1-10 [Internet], [15 agosto 2021]. Disponible en:
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63623398004>
80. **Wang S, Zeng X, Yang Q, Qiao S. 2016.** Antimicrobial peptides as potential alternatives to antibiotics in food animal industry. *Int J Mol Sci* 17: 603. doi:10.3390/ijms17050603
81. **Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, Zhang J. 2019.** *Diseases of Swine*. 7ma ed. Hoboken: Wiley Blackwell. p 807-834.

82. *Zhao J, Dang H. 2010.* Identification of a globally distributed clinical streptomycin-resistance plasmid and other resistance determinants in a coastal bay of China. *Lett Appl Microbiol* 52: 1-8. doi:10.1111/j.1472-765x.2010.02958.x

8. ANEXOS

ANEXO 1. Protocolo de purificación de ADN Genomic de bacterias Gram negativas.

	PROCEDIMIENTO
1	Cultivar las bacterias en 1.5 a 2 ml en tubos de microcentrífuga y centrifugar por 10 min a 5000 x g. Descartar el sobrenadante.
2	Resuspender el pellet en 180 uL buffer de lisis. Incubar a 50°C por 1 hora.
3	Adicionar 200 uL de “Lysis Solution” y 20 uL de “Proteinase K”. Combinar en un vortex o pipetear hasta tener una solución uniforme.
4	Incubar a 65°C por una hora, mezclando ocasionalmente.
5	Adicionar 20 uL de “RNase A Solution”, mezclar e incubar por 10 min a temperatura ambiente.
6	Adicionar 400 uL de etanol al 50% y mezclar.
7	Transferir el preparado a la Columna de Purificación de ADN GenJET Genomic insertado en un tubo colector. Centrifugar por 1 min a 6000 x g. Descartar el contenido del tubo colector. Colocar la Columna de Purificación de ADN GenJET Genomic en un nuevo tubo colector de 2 mL.
8	Adicionar 500 uL de Buffer de lavado I (con etanol). Centrifugar por 1 min a 8000 x g. Descartar el contenido del tubo y colocar la Columna de Purificación de nuevo en el tubo colector.
9	Adicionar 500 uL del Buffer de lavado II (con etanol) en la Columna de Purificación de ADN GenJET Genomic. Centrifugar por 3 min a > 12000 x g. Descartar el contenido del tubo colector y repetir la centrifugación por 2 min.
10	Adicionar 100 uL del “Elution Buffer” previamente calentado al medio de la Columna de Purificación de ADN GenJET Genomic, incubar por 2 min al medio ambiente y centrifugar a 8000 x g por 1 min.
11	Descartar la columna de purificación. Mantener el ADN purificado a -20°C.

ANEXO 2. Lista de cepas positivas y negativas a genes de resistencia antimicrobiana.

CODIGO	ESTREPTOMICINA-ESPECTINOMICINA			SULFONAMIDAS			TETRACICLINAS			APRAMICINA	Total de genes positivos	MDR 3+
	<i>aad</i> (4F)	<i>strA</i> (2F)	<i>strB</i> (3F)	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>sul3</i>	<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	<i>tetC</i>	<i>aac(3)IV</i>		
EC5 K	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	
EC6 K	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	4	
EC7 K	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	3	
EC8 K	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	4	1
EC9 K	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	4	
EC11 K	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	3	
EC12 K	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	3	
EC13 K	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	3	1
EC14 K	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	
EC15 K	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	
EC16 K	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	
EC17 K	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	
EC18 K	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	3	
EC19 K	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	
EC20 K	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	
EC23 K	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	
EC46 K	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	
EC57 K	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	2	
EC117 K	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	3	1
EC118 K	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	3	
EC119 K	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	2	

EC120 K	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	4	1
EC122 K	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	3	1
EC123 K	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	
EC124 K	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	3	1
EC125 K	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	
EC126 K	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	
EC137 K	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	
EC138 K	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	
EC139 K	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	
EC140 K	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	
EC141 K	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	
EC142 K	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	3	
EC143 K	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	
EC155 K	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2	
EC157 K	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	5	1
EC159 K	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	3	
EC166 K	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	4	1
EC167 K	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	4	1
EC168 K	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	3	1
EC-171 K	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	3	1
EC-172 K	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	2	
EC-173 K	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	5	1
EC-178 K	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	3	
EC-179 K	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	3	1
EC-181 K	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	5	1
EC-182 K	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	5	1
EC 184 K	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	5	1
EC-189 K	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	4	
EC-190 K	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	3	1
EC-200 K	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	3	1

EC-201 K	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
EC-202 K	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	
EC-203 K	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	
EC-204 K	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	3	1
EC-206 K	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	3	1
EC-207 K	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	3	1
EC-213 K	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	5	1
EC-215 K	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	4	
EC-218 K	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	3	1
EC-219 K	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	3	
EC-220 K	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	
EC-221 K	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	3	1
EC-225 K	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	5	1
EC-226 K	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	4	
EC-227 K	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	
EC-228 K	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	4	1
EC-230 K	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	
EC-231 K	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	4	1
EC-232 K	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	3	1
EC-233 K	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	5	1
EC-234 K	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
EC-235 K	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	
EC-236 K	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	
EC-237 K	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	5	1
EC-238 K	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
EC-239 K	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	4	1
EC-240 K	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	3	1
EC-241 K	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	4	
EC-242 K	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	3	1
EC-243 K	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	5	1

EC-244 K	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	4	
EC-245 K	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2	
EC-246 K	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	3	1
EC-247 K	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	6	1
EC-248 K	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	5	1
EC-249 K	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	
EC-250 K	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	
EC-251 K	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	
EC-253 K	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	4	1
EC-254 K	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	5	1
EC-255 K	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	
EC-256 K	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	
EC-258 K	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	4	1
EC-260 K	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	
EC-261 K	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	4	
EC-262 K	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	4	1
EC-263 K	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	4	1
EC-264 K	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	
EC-265 K	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	3	
EC-266 K	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	4	1
EC-267 K	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
EC-268 K	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	5	1
EC-269 K	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	3	1
EC-270 K	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	4	1
EC-273 K	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	
EC-274 K	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	
EC-275 K	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	3	1
EC-276 K	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	
EC-277 K	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	
EC-278 K	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	

EC-280 K	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	3	1
EC-281 K	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	2	
EC-283 K	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	3	
EC-284 K	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	3	
EC-285 K	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	
EC-286 K	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	
EC-288 K	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	3	
EC-289 K	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	3	

ANEXO 3 Lista de cepas con su lugar de procedencia.

CODIGO	PROCEDENCIA	CODIGO	PROCEDENCIA	CODIGO	PROCEDENCIA
EC5 K	PUENTE PIEDRA	EC-189 K	SAN BORJA	EC-247 K	HUARAL
EC6 K	PACHACAMAC	EC-190 K	SAN BORJA	EC-248 K	HUARAL
EC7 K	ATE VITARTE-HUAYCAN	EC-200 K	HUACHO	EC-249 K	HUARAL
EC8 K	LURIN	EC-201 K	HUACHO	EC-250 K	HUARAL
EC9 K	PACHACAMAC	EC-202 K	HUACHO	EC-251 K	HUARAL
EC13 K	CHANCAY	EC-203 K	HUACHO	EC-253 K	HUARAL
EC14 K	SJL-VITARTE	EC-204 K	HUACHO	EC-254 K	HUARAL
EC15 K	ATE VITARTE-HUAYCAN	EC-206 K	HUACHO	EC-255 K	HUARAL
EC16 K	LURIN	EC-207 K	HUACHO	EC-256 K	HUARAL
EC17 K	LURIN	EC-213 K	HUARAL	EC-258 K	HUARAL
EC18 K	PACHACAMAC	EC-215 K	HUARAL	EC-260 K	HUARAL
EC19 K	CHANCAY	EC-218 K	HUACHO	EC-261 K	HUARAL
EC20 K	SAN BORJA	EC-219 K	HUARAL	EC-262 K	HUARAL
EC23 K	LURIN	EC-220 K	HUARAL	EC-263 K	HUARAL
EC46 K	HUACHO	EC-221 K	HUARAL	EC-264 K	HUARAL
EC57 K	HUARAL	EC-225 K	HUACHO	EC-265 K	HUARAL
EC117 K	HUACHO	EC-226 K	HUACHO	EC-266 K	HUARAL
EC118 K	HUACHO	EC-227 K	HUACHO	EC-267 K	HUARAL
EC119 K	HUACHO	EC-228 K	HUACHO	EC-268 K	HUARAL
EC120 K	HUACHO	EC-230 K	HUACHO	EC-269 K	HUARAL
EC122 K	HUACHO	EC-231 K	HUACHO	EC-270 K	HUARAL
EC123 K	HUACHO	EC-232 K	HUACHO	EC-273 K	HUARAL
EC124 K	HUACHO	EC-233 K	HUARAL	EC-274 K	HUARAL
EC125 K	HUACHO	EC-234 K	HUARAL	EC-275 K	HUARAL
EC126 K	HUACHO	EC-235 K	HUARAL	EC-276 K	HUARAL
EC155 K	LURIN	EC-236 K	HUARAL	EC-277 K	HUARAL
EC157 K	LURIN	EC-237 K	HUARAL	EC-278 K	HUARAL
EC159 K	LURIN	EC-238 K	HUARAL	EC-280 K	HUARAL

EC-171 K	PACHACAMAC	EC-239 K	HUARAL	EC-281 K	HUARAL
EC-172 K	SJL-VITARTE	EC-240 K	HUARAL	EC-283 K	HUARAL
EC-173 K	PUENTE PIEDRA	EC-241 K	HUARAL	EC-284 K	HUARAL
EC-178 K	PACHACAMAC	EC-242 K	HUARAL	EC-285 K	HUARAL
EC-179 K	PACHACAMAC	EC-243 K	HUARAL	EC-286 K	HUARAL
EC-181 K	ATE VITARTE-HUAYCAN	EC-244 K	HUARAL	EC-288 K	HUARAL
EC-182 K	CHANCAY	EC-245 K	HUARAL	EC-289 K	HUARAL
EC 184 K	SAN BORJA	EC-246 K	HUARAL		