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 de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en *Escherichia coli* aisladas de cerdos sin diarrea en Lima, Perú

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinaria

AUTOR

Andrea Melissa SANTOS VALDIVIA

ASESOR

Dr. Juan José SIUCE MORENO

Lima, Perú

2024



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

Santos A. Detección de genes de resistencia antimicrobiana de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en Escherichia coli aisladas de cerdos sin diarrea en Lima, Perú [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2024.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Andrea Melissa Santos Valdivia
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	73674340
URL de ORCID	No aplica
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Juan José 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	Abelardo Lenin Maturrano Hernández
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	15725076
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Luis Ramiro Luna Espinoza
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	41958220
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Joel André Palomino Farfán
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	46238101

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	FInanciado por CONCYTEC, PROYECTOS DE Ciencias Bàsicas Nº413-2019
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	2022 - 2023
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

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIA

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **lunes 25 de marzo de 2024**, a las **11:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral **Nº 0028-EPMV/FMV-2024** integrado por los siguientes profesores:

Blgo. Dr. Maturrano Hernández Abelardo Lenin	**Presidente del Jurado**
MV. Dr. Siuce Moreno Juan José	**Asesor de la Tesis**
MV. Mg. Palomino Farfán Joel André	**Miembro del Jurado**
MV. Dr. Luna Espinoza Luis Ramiro	**Miembro del Jurado**

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Doña: **SANTOS VALDIVIA ANDREA MELISSA**, para optar el Título Profesional de Médico Veterinaria, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

"DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) EN *Escherichia coli* AISLADAS DE CERDOS SIN DIARREA EN LIMA, PERÚ"

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria de la Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **diecisiete (17).**

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIA** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **12:30** horas, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

UNMSM Firmado digitalmente por MATURRANO HERNANDEZ Abelardo Lenin FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 05.05.2024 16:12:30 -05:00

.....
Maturrano Hernández Abelardo Lenin: Blgo. Dr Prof. Principal DE

UNMSM Firmado digitalmente por SIUCE MORENO Juan Jose FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 03.05.2024 17:14:14 -05:00

.....
Siuce Moreno Juan José: MV. Dr. Prof. Auxiliar DE

UNMSM Firmado digitalmente por PALOMINO FARFAN Joel Andre FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 03.05.2024 15:54:39 -05:00

.....
Palomino Farfán Joel André MV. Mg. Prof. Auxiliar TC

.....
Luna Espinoza Luis Ramiro: MV. Dr. Prof. Auxiliar DE

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Vicerrectorado de Investigación y Posgrado

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Juan Siuce Moreno, en mi condición de asesor acreditado con la Resolución Directoral Nº 0131-EPMV/FMV-2023 de la tesis informe de investigación, cuyo título es **"Detección de genes de resistencia antimicrobiana de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en *Escherichia coli* aisladas de cerdos sin diarrea en Lima, Perú"**, presentado por la bachiller **SANTOS VALDIVIA, ANDREA MELISSA** para optar el título de Médico Veterinario CERTIFICO que se ha cumplidocon lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos,de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de 15% de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del título correspondiente.



Dr. Juan Siuce Moreno
DNI 42807429

DEDICATORIA

A mis padres, por apoyarme siempre a lo largo de toda mi vida, por desvelarse conmigo, por creer en mí y por darme su amor incondicional.

A mis Titos y a mis Papis, quienes me dieron mucho amor y ahora, desde el cielo, iluminan mi camino y celebran cada logro conmigo.

A Stuart, Tomy y Merlín, por ser mi primer empujoncito y enseñarme que 100 g de peso o un par de alitas pueden llenar de amor un hogar completo.

A Mishi y Masha, por llegar en el momento preciso, ser mi motivación a lo largo de la carrera y acompañarme con sus ronroneos y siestas cada vez que me sentaba a redactar esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, el Dr. Juan Siuce, por recibirme en el laboratorio y darme la oportunidad de desarrollar esta tesis y guiarme a lo largo del proceso.

Al Dr. Luis y al Dr. Joel, por estar siempre dispuestos a resolver cualquier duda o brindar su ayuda mientras realizaba la parte práctica en el laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio, por enseñarme y darme los tips necesarios para realizar el temido PCR.

A mis padres, por ser el mejor ejemplo de responsabilidad y dedicación, por brindarme todo lo que necesito y sobre todo por darme tanto amor. A mi hermano, porque ser su hermana mayor me motiva a ser un buen ejemplo y a ser mejor cada día.

A los amigos que formé en este largo camino, por su apoyo y sus enseñanzas, por las risas y los llantos, por su valiosa amistad.

A Jose Antonio, por ser la más bonita compañía durante todos estos años, por su amistad, amor, comprensión, y por iniciar una historia que aún tiene mucho por contar.

ÍNDICE

DEDICATORIA ii
AGRADECIMIENTOS iii
ÍNDICE iv
RESUMEN vii
ABSTRACT viii
LISTA DE CUADROS ix
LISTA DE FIGURAS x
LISTA DE ANEXOS xi
I. INTRODUCCIÓN 1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 5
2.1. Antimicrobianos 5
2.2 Resistencia Antimicrobiana 6
2.2.1 Generalidades 6
2.2.2 Terminología internacional (estandarizada) de la resistencia antimicrobiana 6
2.2.3 Elementos genéticos móviles 6
2.2.3.1 Plásmidos 7
2.2.3.2 Integrones 7
2.2.3.3 Transposones 7
2.2.4 Mecanismos de resistencia antimicrobiana genéticos 8
2.2.4.1 Resistencia natural 8
2.2.4.2 Resistencia adquirida 8
2.2.4.2.1 Transformación 9
2.2.4.2.2 Transducción 9
2.2.4.2.3 Conjugación 9
2.2.5 Mecanismos de resistencia biológicos 10
2.2.5.1 Inhibición enzimática del antibiótico 10
2.2.5.2 Disminución de la Permeabilidad 11
2.2.5.3 Bombas de eflujo 11
2.2.5.4 Modificación del sitio activo 11
2.3 Betalactamasas De Espectro Extendido (BLEE) 12
2.3.1 Generalidades 12

2.3.1.1. Familia TEM....14
2.3.1.2. Familia SHV....14
2.3.1.3. Familia CTX-M....15
2.3.2 Detección fenotípica de BLEE....16
2.3.2.1 Método de disco combinado....16
2.3.2.2 Prueba de sinergia de doble disco....17
2.3.2.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante E-test ESBL....17
2.3.3 Detección genotípica de BLEE....18
2.3.3.1 Reacción en cadena polimerasa (PCR)....18
2.4 *Escherichia coli*....19
2.4.1 Características generales....19
2.4.2 Patotipos....20
2.4.2.1 *E. coli* enteropatógena (EPEC)....20
2.4.2.2 *E. coli* productora de Shiga toxina (EHEC / STEC)....20
2.4.2.3. *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)....21
2.4.2.4. *E. coli* enteroagregativa (EAEC)....21
2.4.2.5 *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)....21
2.4.3 Enfermedades en los cerdos causadas por *E. coli*....21
2.3.3.1 Colibacilosis entérica....21
2.4.3.1.1 Epidemiología....21
2.4.3.1.2 Factores de virulencia y patogenia de ETEC....22
2.4.3.1.3 Signos clínicos y lesiones....23
2.4.3.1.4 Diagnóstico....24
2.4.3.1.5 Tratamiento....24
2.4.3.1.6 Prevención y control....24
2.3.1.2 Enfermedad de los edemas....25
2.4.3.1.1 Epidemiología....25
2.4.3.1.2 Factores de virulencia y patogenia de EDEC....25
2.4.3.1.3 Signos clínicos y lesiones....26
2.4.3.1.4 Diagnóstico....26
2.4.3.1.5 Tratamiento....27
2.4.3.1.6 Prevención y control....27
III. MATERIALES Y MÉTODOS....28
3.1 Lugar de ejecución y periodo de duración....28

3.2 Descripción del material experimental 28
3.3 Materiales y equipos 28
3.3.1 Material Biológico 28
3.3.2 Materiales y equipos de laboratorio 29
3.3.2 Reactivos 29
3.4 Metodología 30
3.4.1 Reactivación de aislados 30
3.4.2 Extracción de ADN 30
3.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa 30
IV. RESULTADOS 33
V. DISCUSIÒN 37
VI. CONCLUSIONES 43
VII. RECOMENDACIONES 44
VIII. LITERATURA CITADA 45
IX. ANEXOS 59

RESUMEN

La resistencia Antimicrobiana (RAM) es un problema de salud pública mundial que crece cada vez más debido al uso y abuso de los antimicrobianos, lo cual trae consecuencias negativas en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Además, las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas que inactivan antimicrobianos betalactámicos y es frecuente hallarla en aislados de *Escherichia coli* (*E. coli*). Ésta es una bacteria reportada como resistente a antimicrobianos usados frecuentemente, algunas de estas cepas pueden ser patógenas y causar problemas gastrointestinales, como es el caso de la Colibacilosis y la Enfermedad de los Edemas en los cerdos. Esta situación, cada vez es más común en animales de producción, incluyendo al cerdo, lo cual representa un gran riesgo para el humano mediante su consumo. En el Perú, existen muy pocos estudios sobre la resistencia genotípica de *E. coli* productora de BLEE en cerdos. Por ello, este trabajo tiene como objetivo determinar la presencia de genes de producción de BLEE en *E. coli* aisladas de hisopados rectales de cerdos sin diarrea procedentes de 4 granjas tecnificadas de Lima, mediante la técnica de PCR convencional. Se evaluaron 186 aislados del cepario del laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Sección Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Estas cepas fueron reactivadas para realizar la extracción de ADN y posteriormente se detectaron los genes bla_{TEM}, $bla_{CTX\text{-}M}$ y bla_{SHV}. Las frecuencias obtenidas fueron de 66.7%, 13.44% y 0%, respectivamente. Además, el 69.89% de total fue positivo al menos a un gen y el 9.7% amplificaron tanto el gen bla_{TEM}, como el gen $bla_{CTX\text{-}M}$. Estos porcentajes nos muestran que en la producción porcina en el Perú existen genes asociados a betalactamasas de espectro extendido (BLEE), lo que representa el riesgo potencial de expresión y transmisión a otras bacterias.

Palabras claves: Resistencia antimicrobiana, RAM, *Escherichia coli*, betalactamasas de espectro extendido, BLEE, cerdos, PCR. gen bla_{TEM}, gen $bla_{CTX\text{-}M}$ y gen bla_{SHV}

ABSTRACT

Antimicrobial resistance (AMR) is a global public health problem that is increasingly growing due to the use and abuse of antimicrobials, it has negative consequences in the treatment of infectious diseases. Furthermore, extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) are enzymes that inactivate β-lactam antimicrobials, frequently found in *Escherichia coli* (*E. coli*) isolates. *E. coli* is a bacteria frequently reported resistant to antimicrobials, some of these strains can be pathogenic and cause gastrointestinal problems, colibacillosis and edema disease in pigs. Thus, increase resistant profiles in production animals, like pigs, which represents a great risk to humans through their consumption. In Peru, there are very few studies on the genotypic resistance of ESBL-producing *E. coli* in pigs. Therefore, the aim of this study was determine the presence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) genes in *Escherichia coli* isolated from rectal swabs of pigs without diarrhea from 4 farms in Lima, using the conventional PCR. 186 samples of the strain collection from the Veterinary Microbiology and Parasitology laboratory, Bacteriology and Mycology Section of the Faculty of Veterinary Medicine of the Universidad Nacional Mayor de San Marcos were evaluated. These strains were reactivated to perform DNA extraction and subsequently the $\boldsymbol{bla_{TEM}}$, $\boldsymbol{bla_{CTX\text{-}M}}$ and $\boldsymbol{bla_{SHV}}$ genes were detected. The frequencies obtained were 66.7%, 13.44% and 0%, respectively. Furthermore, 69.89% of the total were positive for at least one gene and 9.7% amplified both the bla_{TEM} gene and the $bla_{CTX\text{-}M}$ gene. These percentages of ESBL genes represent the risk of expression and transmission to other bacteria.

Key words: Antimicrobial resistance, AMR, *Escherichia coli*, extended spectrum beta-lactamases, ESBL, pigs, PCR. bla_{TEM} gene, $bla_{CTX\text{-}M}$ gene and bla_{SHV} gene

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Secuencia y tamaño de producto de los cebadores *bla*$_{TEM}$, *bla*$_{CTX-M}$ y *bla*$_{SHV}$.

Cuadro 2. Protocolo de amplificación por PCR para la detección de *bla*$_{TEM}$ basado en Marrero - Moreno *et al* (2017)

Cuadro 3. Protocolo de amplificación por PCR para la detección de *bla*$_{SHV}$ basado en Marrero - Moreno *et al* (2017)

Cuadro 4. Protocolo de amplificación por PCR para la detección de *bla*$_{CTX-M}$ basado en Marrero - Moreno *et al* (2017)

Cuadro 5. Mezcla de reacción con un volumen final de 20uL para cada gen.

Cuadro 6. Frecuencia de resistencia antimicrobiana a genes *bla*$_{TEM}$, *bla*$_{CTX-M}$ y *bla*$_{SHV}$.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de transferencia horizontal (Holmes *et al.,* 2016)

Figura 2. Mecanismos de resistencia antimicrobiana (Modificado de Crofts *et al.,* 2017)

Figura 3. Mecanismo de acción de los betalactámicos (Suarez y Gudiol, 2009).

Figura 4. Prueba positiva del disco combinado (Camacho *et al.,* 2004)

Figura 5. Prueba positiva de sinergia de doble disco (Drieux *et al.,* 2014).

Figura 6. Prueba E-test ESBL positiva (Perozo y Castellano*,* 2009).

Figura 7. Infección intestinal por *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) (Barros *et al.,* 2023)

Figura 8. Infección por *E. coli* productora de shiga Toxina (Zimmerman *et al.*, 2012).

Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la ampliación del gen bla_{TEM} (859 pb).

Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la ampliación del gen bla_{SHV} (853 pb).

Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la ampliación del gen $bla_{CTX\text{-}M}$ (585 pb).

LISTA DE ANEXOS

Anexo1. Esquema de clasificación de betalactamasas (Adaptado de: Bush y Jacoby, 2010)

Anexo 2. Protocolo de purificación de ADN Genomic de bacterias Gram negativas.

Anexo 3. Lista de cepas utilizadas en el presente estudio y lugares de procedencia

Anexo 4. Lista de cepas positivas a gen *bla*$_{CTX-M}$

Anexo 5. Lista de cepas positivas a gen *bla*$_{TEM}$

Anexo 6. Distribución de cepas positivas al gen *bla*$_{CTX-M}$ en las 4 granjas muestreadas

Anexo 7. Distribución de cepas positivas al gen *bla*$_{TEM}$ en las 4 granjas muestreadas

I. INTRODUCCIÓN

El término antibiótico hace referencia a cualquier molécula orgánica que inhibe o elimina los microorganismos con fines bacterianos mediante distintos mecanismos. Este término fue utilizado por primera vez en publicaciones científicas de los años 1942-1943, con la finalidad de englobar compuestos químicos como la penicilina y la actinomicina, los cuales eran una novedad en la comunidad científica en ese entonces (Waksman, 1973). Luego de más de 60 años de tener a los antibióticos activamente en el mercado, se han producido y consumido millones de toneladas de estos medicamentos, lo cual naturalmente ha provocado que se puedan encontrar fácilmente y a un costo bastante accesible. Lamentablemente, la gran necesidad que surgió luego del descubrimiento de estos medicamentos ha conllevado una gran desventaja, la Resistencia Antimicrobiana (RAM), la cual es un fenómeno natural y algunos factores como el uso indiscriminado de gran cantidad de antibióticos disponibles y su inadecuado uso de parte del hombre, ha traído como consecuencia el rápido aumento de RAM y debido a ello, actualmente existen enfermedades que ya no pueden ser correctamente controladas (Davies y Davies, 2010; Prescott, 2014).

La RAM es un problema de salud pública mundial que crece cada vez más debido al uso y abuso de los antibióticos, lo cual trae consecuencias negativas en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Se estima que el uso de antibióticos se ha incrementado notoriamente en el último medio siglo, y la cantidad de vidas que ha cobrado la resistencia antimicrobiana es de aproximadamente 500 millones de vidas en todo el mundo (Strachan y Davies, 2017). Lo más preocupante de toda esta situación, es que a medida que la presencia de resistencia antimicrobiana se está incrementando, el descubrimiento de nuevos antibióticos está disminuyendo, sin embargo, el consumo de estos antibióticos sigue en aumento (O'Neill, 2014).

Dentro de las bacterias reportadas como resistentes a antimicrobianos comunes, se encuentra la *Escherichia coli (E. coli)*, un bacilo Gram negativo perteneciente a la familia

Enterobacteriaceae que habita normalmente en el tracto gastrointestinal de animales y humanos. Sin embargo, algunas cepas pueden ser patógenas y llegan a causar, en su mayoría, problemas gastrointestinales.

Las Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) se caracterizan por inactivar antibióticos betalactámicos mediante hidrólisis, incluyendo a cefalosporinas, penicilinas y monobactámicos. Actualmente, las cepas de *E. coli* productoras de BLEE son halladas en una mayor proporción en los animales que son destinados a la producción de alimentos, lo que evidencia la posibilidad de que sean fuente o reservorio de estas bacterias, lo cual contribuiría a su propagación. La RAM puede ser transmitida mediante el consumo de carnes crudas o mal cocidas, el contacto directo entre el humano y el animal en la ganadería y el procesamiento de las carnes (Dorado-García *et al.*, 2018; Samanta & Bandyopadhyay, 2020).

A lo largo de los últimos años, la Organización Mundial de la Salud (OMS) viene implementando protocolos de vigilancia para la RAM. Uno de ellos es el protocolo ¨Triciclo¨, el cual se centra en la vigilancia mundial de *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido (ESBL-Ec) y utiliza el enfoque de ¨Una Salud¨, ya que aborda simultáneamente la salud humana, cadena alimentaria y medio ambiente. Si bien, ESBL-Ec no representa la problemática mundial de la RAM, se le considera un indicador representativo y relevante para este problema ya que este tipo de infecciones significan una morbilidad y mortalidad graves en humanos, costos de salud y considerables cargas de enfermedad (WHO, 2021).

Los antimicrobianos más utilizados en animales de producción, incluyendo los cerdos, son las betalactámicos, por lo que la infección por microorganismos productores de BLEE obligan al uso de antibióticos de últimas generaciones, cuyos tratamientos podrían ser más costosos y largos, causando un impacto negativo en la producción (Ewers *et al.,* 2012). En el caso de los cerdos específicamente, hay diversas maneras en las que *E. coli* BLEE puede transmitirse entre los animales en el matadero. Una de ellas es el transporte hacia el matadero ya que los cerdos portadores pueden diseminar la bacteria hacia otros animales sanos e incluso puede contaminar los camiones. Durante el alojamiento previo al sacrificio también hay una gran posibilidad de contagio debido al contacto directo que existe en esa etapa. En el caso del faenamiento, puede existir contaminación cruzada, afectando las carcasas porcinas (Trongjit *et al.,* 2016; Schmithausen *et al.,* 2018).

Internacionalmente se han realizado diversos estudios sobre la detección de BLEE en producciones porcinas. Una de los primeros reportes sobre BLEE descritas en cepas de *E. coli* de cerdos sanos fue en Hong Kong, Duan *et al*., (2006), quienes hallaron sólo un 2% de *E. coli*

productora de BLEE en cerdos, hallando los genes bla_{CTX-M} y bla_{TEM}. Ese mismo año, otro estudio publicado en España por Blanc *et al.* (2006), señala que 39/131 de *E. coli* aisladas de cerdos eran productoras de BLEE, de las cuales el 73% tenían el gen $bla_{CTX-M-1}$ y, a comparación del estudio anterior, sí se halló el gen bla_{SHV}. Un estudio más actual es el de Marrero-Moreno *et al,* (2017), quién halló la prevalencia de enterobacterias productoras de BLEEs en diferentes granjas de una provincia de Cuba, siendo 24.3% la mayor. Además, el gen que más predominó fue bla_{CTX-M}, seguido de bla_{TEM} y no se detectó el gen bla_{SHV}. En dicho estudio se evidenció la presencia de *E. coli* BLEE en cerdos aparentemente sanos, demostrando así, que la microbiota intestinal es un posible reservorio de estos microorganismos en los animales, siendo un vehículo importante para su transferencia al hombre y a otros animales.

En el Perú, se han realizado estudios sobre enterobacterias y resistencia antimicrobiana en animales de producción. La mayoría de artículos están enfocados en la detección fenotípica de RAM, como el estudio de Saldarriaga *et al.* (2000), quien evaluó la presencia de RAM en lechones lactantes, hallando que la estreptomicina y el ácido nalixídico fueron los antibióticos a los que las cepas de *E. coli* presentaban mayor resistencia. Quince años más tarde, Toledo *et al.* (2015) determinó la sensibilidad antimicrobiana de *E. coli* aisladas de hisopados rectales de cerdos destinados a consumo humano, encontrando que todas las cepas fueron resistentes a las tetraciclinas, seguida de la cefalotina y ampicilina. Ruiz-Roldán *et al.* (2018), realizaron un estudio para identificar enterobacterias en muestras de carne provenientes de mercados de abasto. Dicho estudio tuvo como resultado que la bacteria más prevalente fue *E. coli*, siendo aislada en el 80% de las muestras de carne de cerdo, además los niveles de resistencia a múltiples antimicrobianos fue de 86.4% en cerdos. Sin embargo, solo identificaron *E. coli* productora de BLEE en las muestras de pollo y de vacuno. Un estudio más reciente publicado por Luna *et al.* (2023), tuvo como objetivo realizar el aislamiento y analizar 87 cepas de *E. coli* procedentes de muestras fecales obtenidas de cerdos sanos de granjas intensivas en Lima, de las cuales fueron secuenciadas 17 cepas. Se hallaron 15/17 cepas que portaban genes $bla_{TEM,}$ de los cuales predominaban $bla_{TEM\ 1b,}$ y solo 1/17 $bla_{CTX-M-55,}$ la cual demostró ser una BLEE al conferir resistencia a la ceftriaxona, cefepima, cefotaxima y aztreonam.

Durante los últimos 20 años, el consumo de cerdo ha ido tomando cada vez más importancia, siendo actualmente la carne más consumida en el mundo y la tercera en el Perú (Minagri, 2020). Dichos datos, sumados a información previa sobre la importancia de la vigilancia de *E. coli* productoras de BLEE y los pocos reportes en el Perú, evidencian la importancia de realizar estudios en nuestro entorno sobre ello. A pesar de que se han realizado estudios en carnes, solo existe un artículo en que reportan la presencia de estos genes en cerdos sanos en Lima (Luna *et al*., 2023). Debido a esto, el presente estudio tiene como objetivo determinar la frecuencia de

genes de resistencia (*bla*$_{TEM}$, *bla*$_{CTX-M}$ y *bla*$_{SHV}$) codificantes de BLEE en *E. coli* aisladas de cerdos sin diarrea mediante la técnica de PCR convencional.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Antimicrobianos

El término antimicrobiano deriva de las raíces griegas anti (contra), micro (pequeño) y bios (vida), lo cual hace referencia a una sustancia que actúa contra diferentes microorganismos (Asif, 2017). Los agentes antimicrobianos pueden clasificarse según el organismo al que atacan, los cuales pueden ser bacterias, virus, hongos o parásitos, denominándose antibióticos o antisépticos, antivirales, antifúngicos o antimicóticos y antiparasitarios, respectivamente (OPS, 2019; Di Martino, 2022) Y también pueden ser clasificados según su modo de acción, pueden matar al microorganismo (microbiocida) o puede retrasar su crecimiento (microbioestático) (Asif, 2017; Di Martino, 2022)

Los antimicrobianos son frecuentemente utilizados como tratamiento tanto en casos de enfermedades bacterianas, como en caso de infecciones con levaduras y parásitos (Davies y Davies, 2010). En el año 1928, Alexander Fleming descubrió el primer antibiótico, la penicilina, la cual sigue siendo muy utilizada en estos tiempos. Este fue el inicio del descubrimiento de una serie de antibióticos como las sulfonamidas, aminoglucósidos, entre otros, que revolucionaron la medicina de esa época, convirtiéndose en la base para descubrir muchos avances médicos del siglo XX (O'Neill, 2014). Sin embargo, a medida que el tiempo avanzaba, la resistencia hacia los antibióticos empezaba a ser notoria entre 1 a 5 años luego de su introducción al mercado (Bush, 2004).

2.2 Resistencia Antimicrobiana

2.2.1 Generalidades

La resistencia antimicrobiana (RAM) es una amenaza mundial que lleva existiendo miles de años en la Tierra, desde mucho antes que los antibióticos fueran descubiertos (Morrison y Zembower, 2020). El término RAM hace referencia a la resistencia a los medicamentos antimicrobianos en agentes infecciosos, además, se ha reportado que existe una creciente propagación de bacterias multirresistentes causantes de diversas infecciones comunes y a su vez son resistentes a antibióticos existentes (Agnew *et al*., 2021). De esta manera, la RAM tiene un impacto negativo en la salud, ya que reduce la eficacia del tratamiento de muchas infecciones, además, puede aumentar la gravedad, la incidencia y el costo de la infección. Se ha demostrado que el uso de antimicrobianos en animales está ligado a la RAM de patógenos en humanos, especialmente en bacterias entéricas zoonóticas como *Salmonella* spp*, Campylobacter* spp*, Enterococcus* spp*, E. coli*, entre otros (McEwen y Collignon, 2018).

2.2.2 Terminología internacional (estandarizada) de la resistencia antimicrobiana

En el año 2008, se realizó una junta entre miembros del Centro Europeo para la Prevención y control de enfermedades (ECDC) y los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) con el objetivo de establecer conceptos para las bacterias resistentes asociadas a afecciones médicas. Más adelante, más expertos se incorporaron a esta junta y finalmente se decidió establecer estas definiciones para bacterias de diferentes familias, entre ellas la *Enterobacteriaceae* debido a su gran importancia clínica y a los reportes de resistencia antimicrobiana registrados. El término multidrogo-resistente (MDR) hace referencia a ¨la no susceptibilidad adquirida al menos a un agente en tres o más categorías antimicrobianas¨, mientras que el término extensivamente drogo-resistente (XDR) indica ¨la no susceptibilidad adquirida al menos a un agente en todas las categorías de antimicrobianos excepto dos o menos categorías¨, finalmente, el término pandrogo-resistente indica ¨la no susceptibilidad a todos los agentes de todas las categorías antimicrobianas¨ (Magiorakos *et al.*, 2012)

2.2.3 Elementos genéticos móviles

Los elementos genéticos móviles (MGEs, por sus siglas en inglés) son factores clave en la resistencia antimicrobiana ya que son fragmentos de ADN móviles, los cuales se pueden transferir entre genomas bacterianos. Los más conocidos son los plásmidos, integrones y transposones.

2.2.3.1 Plásmidos

Los plásmidos son porciones de ADN extracromosómico que tiene la capacidad de autoreplicarse y de llevar información adicional como por ejemplo genes de resistencia antimicrobianos. Se pueden agrupar en diferentes familias denominadas ¨Inc¨ debido a que esta clasificación se basa en la incompatibilidad de los plásmidos, por lo que no pueden coexistir dentro de una misma célula bacteriana. Dentro de estas familias se encuentran los IncX, los cuales son conocidos por codificar diversos genes de resistencia. Los IncF se encuentran distribuidos en *E. coli* patógenas y no patógenas y está involucrado en la transferencia de los genes *bla* $_{CTX\text{-}M}$ y *mcr-1*, el cual confiere resistencia a la colistina. Asimismo, existen diversas familias como Inc A, H, K, que han demostrado codificar BLEE (Bozcal, 2019).

Lo plásmidos también pueden transportar integrones y transposones, y luego transferirse mediante la conjugación, de esta manera, hay una mayor difusión de genes multirresistentes. Además de transportar genes de resistencia, los plásmidos también tienen un gran rol en el transporte de genes de virulencia como por ejemplo la fimbria F4 de ETEC (Navarro y Miró, 2007).

2.2.3.2 Integrones

Los integrones son elementos genéticos que permiten el almacenamiento y adquisición de genes que están dentro de estructuras móviles denominadas casetes, los cuales son elementos pequeños que contienen uno o dos genes (Navarro y Miró, 2007). La estructura de los integrones incluye a los casetes, un gen codificante de la integrasa (Intl) que se en carga de la adquisición y escisión de los casetes, un sitio de recombinación (attl) y un promotor para la expresión de los genes casete (Pc) (Domingues *et al.,* 2012). Varios casetes pueden ser insertados en un integrón, creando así una matriz de casetes, lo cual puede conferir múltiples resistencias. Existen diferentes tipos de integrones, denominados Intl1, Intl2, Intl3, y así sucesivamente, siendo la primera la más común en casos de resistencia antimicrobiana asociada a pacientes clínicos (Partridge *et al.,* 2018).

2.2.3.3 Transposones

Los transposones también son fragmentos de ADN que, mediante un mecanismo llamado transposición, pueden variar su posición en el genoma. Se dividen en 3 clases: secuencia de inserción (IS, por sus siglas en inglés), transposones (Tn) compuestos y no compuestos. Las IS tienen una secuencia repetida (IR) en cada extremo y solo contiene información genética para movilizarse, lo cual es posible gracias a que codifican enzimas llamadas transposasas (Tnp) que se encargan de que la IS se integre a su sitio diana. Los transposones, a diferencia de la IS, pueden contener material genético adicional como genes de resistencia antimicrobiana. Los Tn simples

contienen IR en sus extremos y genes adicionales, mientras que los Tn complejos se encuentran flanqueados por dos IS, en donde una de ellas codifica la transposasa. Todos estos elementos tienen un rol muy importante en la difusión de BLEE (Partridge *et al.,* 2018; Bozcal, 2019).

2.2.4 Mecanismos de resistencia antimicrobiana genéticos

2.2.4.1 Resistencia natural

La resistencia antimicrobiana natural se puede clasificar en intrínseca o inducida. La resistencia intrínseca es propia de cada especie bacteriana, ellas tienen la capacidad innata de ser resistente a determinados antibióticos. Los factores ambientales como la radiación, cambios de la luz o del pH también pueden provocar la aparición de bacterias resistentes (Ali *et al.,* 2018). Por otro lado, la resistencia inducida hace referencia a las bacterias que naturalmente presentan ciertos genes, sin embargo, se expresan luego de exponerse a un antibiótico (Reygaert, 2018).

La resistencia intrínseca está relacionada a factores genéticos, es decir, este rasgo se causa por una mutación espontánea sin la necesidad de haber estado expuesta previamente a los antibióticos, se refiere a la existencia de algunos genes que podrían causar un fenotipo de resistencia (Davies y Davies, 2010; Cox y Wright, 2013). Algunos mecanismos intrínsecos son la falta de permeabilidad de la membrana que impide el ingreso del antibiótico, inactivación enzimática, bombas de eflujo y la carencia de sitios diana en la bacteria, lo cual impide la unión del antibiótico (Mosquito *et al.,* 2011).

2.2.4.2 Resistencia adquirida

La resistencia adquirida es la más preocupante ya que las bacterias se vuelven resistentes a antibióticos a los cuales eran susceptibles. El factor principal de este tipo de resistencia antimicrobiana es el uso excesivo de los antibióticos. Las bacterias pueden adquirir resistencia mediante la mutación de genes bacterianos o mediante la adquisición de ADN extraño que codifica genes de resistencia (Mosquito *et al.,* 2011). Este tipo de resistencia está ligado a errores en la replicación del ADN que no son específicos. Algunas veces, estos errores no traen ventajas a la bacteria, pero en otros, puede ser beneficioso, por lo tanto, se transmiten de manera vertical directamente a toda su progenie durante la replicación del ADN (Martinez y Baquero, 2000).

La transferencia horizontal se refiere a la capacidad de transmitir genes entre especies. Existen tres mecanismos de la transferencia horizontal de genes: la transformación, la transducción y la conjugación (Figura 1) (Reygaert, 2018; Nadeem *et al.*, 2020; Morrison y Zembower, 2020).

2.2.4.2.1 Transformación

La transformación es un mecanismo que hace referencia a la alteración genética de una bacteria al incorporar a su estructura, ADN, plásmidos u otra materia genético extraño, los cuales se encuentran fuera de la bacteria como remanente de la muerte y lisis de otra bacteria y pasa a través de la membrana citoplasmática mediante un canal. Una condición importante para que se lleve a cabo este proceso, es que la bacteria se encuentre en un estado denominado ¨competente¨, es decir, que, debido a factores estresantes como la presencia de un antibiótico o deficiencias nutricionales, la membrana de la célula permite la transferencia de material genético. Este mecanismo se encuentra mucho mejor caracterizado en bacterias Gram positivas como *Streptococcus* spp. y *Staphylococcus* spp, que en bacterias Gram negativas como *Neisseria gonorrhoeae* (Nadeem *et al*. 2020).

2.2.4.2.2 Transducción

La transducción es un mecanismo causado por los bacteriófagos, los cuales luego de infectar y provocar la lisis de la bacteria, encapsulan parte de su material genético. De esta manera, cuando infectan a otra célula, transfieren el material genético que obtuvieron de la bacteria previa, pudiendo así, pasar genes de resistencia antimicrobiana (Nadeem *et al*. 2020).

2.2.4.2.3 Conjugación

Este es el mecanismo que más disemina genes de resistencia en la naturaleza. Se da cuando hay un contacto directo entre dos células, posteriormente se forma un puente por el cual se transfiere un plásmido de una célula a otras. La importancia radica en que dicho plásmido puede contener diversos genes que codifican resistencia a muchos fármacos (Nadeem *et al*. 2020). Los plásmidos que presentan genes de resistencia a betalactámicos se transfieren mediante la conjugación en *Pseudomonas* spp y especies *Enterobacteriaceae* incluso se ha podido detectar bacterias que contienen BLEE en las superficies de hospitales, así como en aguas residuales que pasan por debajo de ellos, por lo cual es de gran riesgo en entornos clínicos (Lerminiaux y Cameron, 2019).

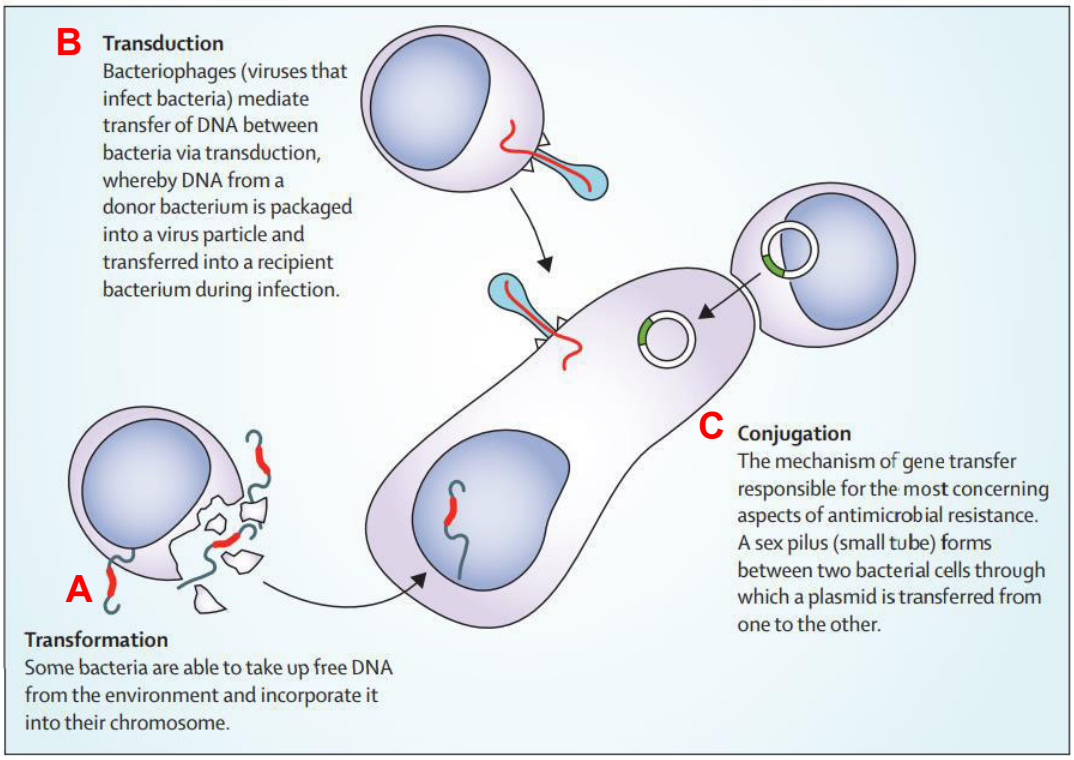


Figura 1. Mecanismos de transferencia horizontal (Holmes *et al.,* 2016)

2.2.5 Mecanismos de resistencia biológicos

2.2.5.1 Inhibición enzimática del antibiótico

La inactivación de antibióticos es una modificación directa que se da mediante la alteración química del antibiótico y la destrucción de la molécula de antibiótico. Las enzimas bacterianas añaden un grupo químico a sitios vulnerables del antibiótico, evitando que este no pueda unirse a su proteína y generando resistencia (Blair *et al*., 2014). En estos casos es común la transferencia de grupos acetilo, contra los aminoglucósidos, cloranfenicol y fluoroquinolonas; y los grupos fosforilo y adenilo contra los aminoglucósidos. Por ejemplo, en el caso del cloranfenicol, las enzimas conocidas como cloranfenicol acetil transferasas (CATS) unen covalentemente un grupo acetilo a cada uno de sus dos grupos hidroxilo, evitando de esta manera que se una a los ribosomas (Blair *et al*., 2014).

La destrucción de la molécula de antibiótico se refiere a la producción de enzimas que degradan o hidrolizan a los antibióticos como por ejemplo betalactámicos, aminoglucósidos, fenicoles y macrólidos. En el caso de los antibióticos betalactámicos, son hidrolizados por las betalactamasas y las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), enzimas presentes en bacterias gramnegativas como *E. coli, K. pneumoniae y P. aeruginosa* (Blair *et al.,* 2015).

2.2.5.2 Disminución de la Permeabilidad

Las bacterias gramnegativas tienen la característica de tener una membrana externa gruesa conformada por una bicapa lipídica, la cual hace complicado el paso de compuestos hidrófilos. Debido a ello, es necesaria la presencia de canales de porina para permitir el paso de estos compuestos. Es por este motivo que la pérdida de estos canales son una causa de la resistencia antimicrobiana (Nadeem *et al.*, 2020). Las principales causas de este mecanismo son la disminución del número de canales de porina o la mutación, lo cual puede afectar su función. La resistencia de los *Enterobacteriaceae* se produce al reducir el número porinas o de detener su producción. Cada especie de bacteria tiene porinas específicas, por ejemplo, *P. aeruginosa* produce la porina OprD, sin embargo, la falta de ésta provoca resistencia al imipenem y meropenem (Blair *et al.,* 2015; Christaki *et al.,* 2019).

2.2.5.3 Bombas de eflujo

Las bombas de eflujo son complejos bacterianos dependientes de energía ubicados en la membrana citoplasmática, que eliminan sustratos, incluyendo los fármacos, desde el interior de la célula. De esta manera son considerados uno de los principales factores de la resistencia antimicrobiana (Rahman *et al*., 2017; Amaral *et al*., 2014). Las bombas de eflujo tienen la capacidad de bloquear los canales de calcio del antibiótico, alteran su diseño químico y mejoran la tolerancia a los antibióticos en los biofilms. Se han identificado diversas bombas de eflujo involucradas en la RAM tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas, siendo más común en las últimas, para sustratos como tetraciclinas, macrólidos y cloranfenicol. En 1980 se describió la primera bomba de eflujo que eliminó a la tetraciclina de *E. coli* (Ball *et al.* 1980). Existen 5 familias de bombas de eflujo, por ejemplo, la bomba AcrAD pertenece a la familia de división de nodulación de resistencia (RND), la cual está presente en bacterias Gram negativas como *E. coli* y actúa frente a los aminoglucósidos (Abushaheen *et al.,* 2020).

2.2.5.4 Modificación del sitio activo

Este tipo de resistencia antimicrobiana se debe a una modificación o variación de la estructura diana, provocando que la afinidad al antibiótico se vea afectada. Los betalactámicos se unen a una estructura conocida como *Peniciling- binding proteins* (PBPs), un complejo enzimático que se encuentra en la pared celular y permite la síntesis del peptidoglicano. Si existe alguna mutación en los PBP de la bacteria, los betalactámicos ya no tendrían efecto y se generaría una resistencia hacia ellos. Por otro lado, también puede existir la modificación ribosomal, es decir, se produce una mutación a nivel de las proteínas ribosómicas, lo cual conlleva a la resistencia a tetraciclinas, aminoglucósidos y macrólidos (Moreno et al., 2009; Nadeem *et al.*, 2020). También se puede dar modificaciones en la síntesis de ácidos nucleicos, como en el ADN

girasa o la topoisomerasa IV, lo cual causa cambios estructurales en la girasa y topoisomerasa provocando que la capacidad de las fluoroquinolonas para unirse a dichos componentes se vea afectada (Nadeem *et al.*, 2020).

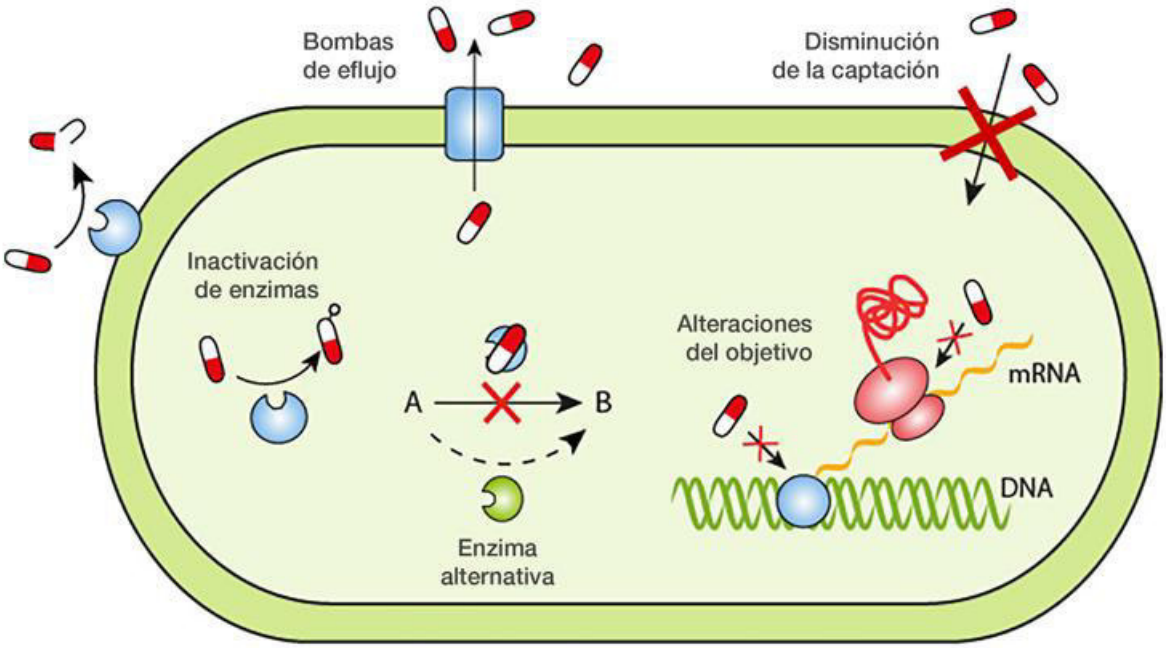


Figura 2. Mecanismos de resistencia antimicrobiana (Modificado de Crofts *et al.,* 2017).

2.3 Betalactamasas De Espectro Extendido (BLEE)

2.3.1 Generalidades

Los antibióticos betalactámicos incluyen a las penicilinas, cefalosporinas, carbapenemasas, monobactámicos, son uno de los grupos de antibióticos más utilizados cuya estructura consiste en un anillo betalactámico de 4 lados que tienen la capacidad de evitar la síntesis de peptidoglicano, de esta manera irrumpe en la formación de la pared bacteriana. El anillo betalactámico es similar a la región de unión de las transpeptidasas o PBP (enzima que ayuda a la formación de tetrapéptidos a partir de los pentapéptidos en la última fase de la formación de la pared bacteriana), por lo que se une y evita la formación de la pared, dejando expuesta a la bacteria, la cual muere por variaciones en la presión oncótica. Otro mecanismo de acción es la activación de una autolisina bacteriana endógena, la cual causa la destrucción del peptidoglucano (Figura 3) (Suarez y Gudiol, 2009).

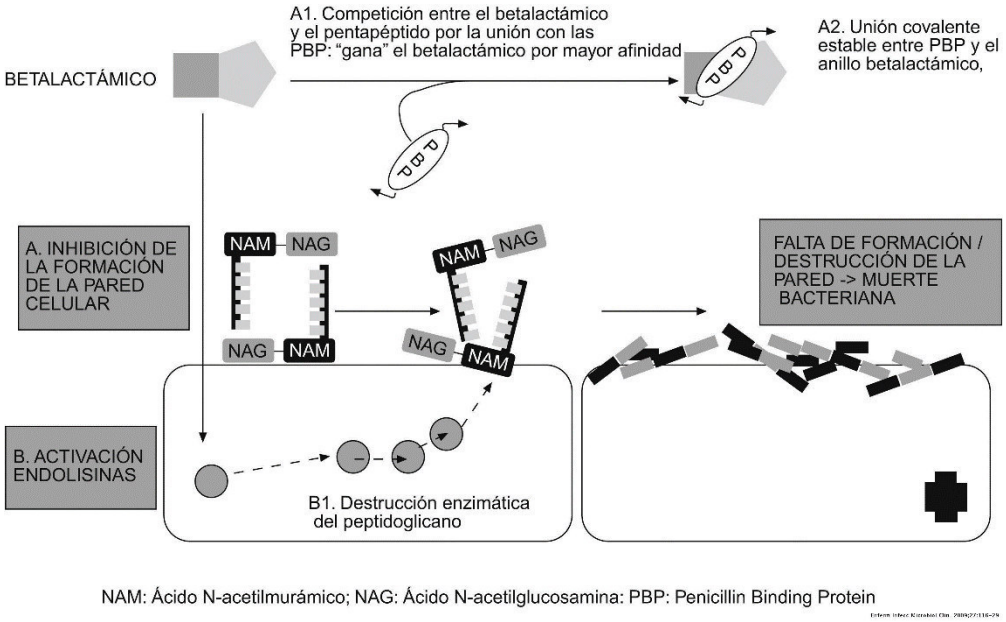


Figura 3. Mecanismo de acción de los betalactámicos (Suarez y Gudiol, 2009).

El principal mecanismo de resistencia a esta clase de antibióticos se lleva a cabo mediante la acción de las betalactamasas, las cuales son enzimas que inactivan el antibiótico hidrolizando el enlace amida del núcleo betalactámico, provocando que su anillo se abra y no pueda unirse a las PBP (Suarez y Gudiol, 2009, Mosquito *et al.,* 2011).

Las betalactamasas son codificadas por genes tales como bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{CARB}, bla_{OXA}, $bla_{CTX\text{-}M}$ y bla_{GES}, siendo los principales TEM, SHV Y CTX-M. Tanto TEM como SHV han sido reportados desde los años 80, mientras de CTX-M se ha expandido durante los últimos años, predominando en infecciones nosocomiales y en ciertas comunidades (Rivera *et al.,* 2014; Reygaert, 2018). La primera clasificación de betalactamasas según su estructura, fue realizada por Ambler en el año 1980, determinando 4 clases: A, B, C y D. La clase B se caracterizan por tener moléculas de zinc llamadas metalo-ß-lactamasas, las cuales atacan los grupos carbonilo y amida de los betalactámicos. Por otro lado, las otras clases presenta serina, enzima que provoca la hidrólisis (Amber, 1980). También se han establecido clasificaciones según sus características funcionales como sustrato e inhibidor (Anexo 1) (Bush *et al.,* 1995; Richmond y Sykes, 1973).

Existen betalactamasas codificadas por el gen *amp*C, resistentes a la ampicilina, así como genes *bla*, genes de betalactamasa, las cuales son denominadas betalactamasas de espectro extendido (BLEE) si es que también tienen resistencia a las cefalosporinas de última generación. Éstas son resistentes a una gran cantidad de fármacos, sin embargo, son sensibles a inhibidores de la betalactamasa como el ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam (Arce, 2014; Reygaert,

2018). Los genes que codifican BLEE pertenecen a diversas familias, siendo las principales TEM, SHV Y CTX-M.

2.3.1.1. Familia TEM

La primera familia se denomina así debido a que fue hallada en un aislado de *E. coli* de un hemocultivo perteneciente a un paciente de origen griego llamado Temoneira (Medeiros, 1984). TEM-1 fue la primera descrita en la década de 1960 y posteriormente se describió TEM-2, la cual solo variaba en la sustitución de un aminoácido con respecto a la TEM-1. Dichas enzimas fueron las progenitoras de las casi 250 variantes TEM que se conocen hasta la fecha (Castañera *et al.,* 2021). Este tipo de betalactamasas codifican la resistencia a la ampicilina, sin embargo, a pesar que la mayoría son BLEE, existen algunas descritas fenotípicamente como resistentes a los inhibidores o que no confieren resistencia a las cefalosporinas de espectro extendido, por lo que no son consideradas BLEE (Smet *et al.,* 2010). El peso de los genes pertenecientes a esta familia varía entre 861-925 pb según datos del sistema BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

Antes del año 2000, TEM tuvo su apogeo a nivel mundial, en donde se observó que la prevalencia de sus variantes estaba relacionada a la ubicación geográfica. Por ejemplo, en Francia era común TEM-3, mientras que TEM-10 lo era en EE.UU., y TEM-26 fue detectada en aislamientos en todo el mundo. Sin embargo, actualmente, los hallazgos de TEM son menos frecuentes (Castañera *et al.,* 2021).

Todos los integrantes de la familia TEM son transportados mediante los tres primeros transposones que han sido identificados (Tn1, Tn2 y Tn3). Tn3 puede transponer el gen de resistencia a la ampicilina junto con la resistencia a BLEE. Probablemente estos genes no son compatibles con la formación de casetes, ya que no se han podido identificar en integrones (Poirel, 2008).

2.3.1.2. Familia SHV

La familia SHV fue descrita por primera vez en 1970 en un aislado de *E. coli* y su nombre se debe a que presenta una variable del reactivo sulfhidrilo (Pitton, 1972). Existen más de 100 variantes asociadas con la resistencia de carbapenémicos, monobactámicos y cefalosporinas de tercera generación (Poirel *et al.,* 2003). Esta familia se divide en tres subgrupos: el 2b, los cuales pueden hidrolizar penicilinas y cefalosporinas de primera generación y además, son inhibidas por el ácido clavulánico y tazobactam; el 2br, los cuales son resistentes al ácido clavulánico; y 2be, quienes también son capaces de hidrolizar a la cefotaxima, ceftazidima y aztreonam (Liakopoulos *et al.,* 2016).

SHV-2 fue la primera BLEE descrita en 1985, mostró resistencia a cefalosporinas de tercera generación en una cepa de *Klebsiela ozaenae* en Alemania y variaba solo por una sustitución de un aminoácido a comparación de SHV-1 (Huletsky *et al.,* 1993). Las BLEE de la familia SHV más comunes son SHV-15 Y SHV-12, halladas con más frecuencia en aislados de *K. pneumoniae* (Castañera *et al.,* 2021). La presencia de SHV se ha observado en ambientes acuáticos, animales productores de alimentos, animales silvestres, animales de compañía y vegetales (Liakopoulos *et al.,* 2016). Los genes que conforman la familia SHV registrados en el sistema BLAST tienen un peso de 861 pb.

SHV-1 forma parte de un plásmido conjugativo llamado p453, y su ancestro más probable mediado por plásmidos es una penicilinasa cromosómica de una especie hallada en una *K. pneumoniae* aislada de muestras fecales de recién nacidos. Dentro del entorno genético de SHV, se observa a presencia constante de IS26 y también de Tn e In. Sin embargo, no hay mucha información sobre su movilidad mediante transposición. Específicamente en el entorno de *bla* $_{SHV\text{-}5}$, se ha descrito el Int3, el cual contiene genes que confieren resistencia a aminoglucósidos (Navarro y Miró, 2007). Los SHV que se más se han expandido en todo el mundo son SHV-2, SHV-2α, SHV-5 y SHV-12. Su gran propagación se debe a los plásmidos, los cuales pertenecen a siete grupos de replicones: A/C, F, HI2, I1, L/M, N, X3 (Liakopoulos *et al.,* 2016).

2.3.1.3. Familia CTX-M

La familia CTX-M (cefotaxima de Munich) es denominada así debido a un reporte en la cual se aisló por primera vez de una *E. coli* proveniente del oído de un niño en Munich, Alemania (Bauernfeind *et al.,* 1990). Estos genes se originaron de los cromosomas de la especie *Kluyvera*. A pesar de ser descritas después de TEM y SHV, se expandieron desde inicios del 2000, y desde ahí son conocidas como la familia BLEE más común. Las primeras variantes hidrolizaban muy bien la cefotaxima y la ceftriaxona, pero no la ceftazidima, sin embargo, variantes descritas posteriormente presentan una mejor actividad hidrolítica contra dicho antibiótico (Castañera *et al.,* 2021). Estas enzimas están ampliamente diseminadas principalmente dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, sin embargo, también se han identificado en *Pseudomonas aeruginosa, Aeromonas* spp, *Vibrio cholerae,* entre otros, lo cual indica que existe una alta transmisión de estos genes (Bergšpica *et al.,* 2020). La familia CTX-M ha sido hallada tanto en animales (de producción, de compañía, salvajes), pacientes hospitalarios y extrahospitalarios, alimentos crudos y fuentes ambientales (Cantón *et al.,* 2012). Los genes que conforman esta familia pesan 876-881 pb según datos del sistema BLAST y se dividen en cinco grupos que son asociados por sus

similitudes genéticas: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 and CTX-M-25. Los grupos más comunes son CTX-M-15, CTX-M-3 y CTX-M-1 (Castañera *et al.,* 2021).

Los elementos genéticos móviles asociados a la adquisición de estos genes son las secuencias de inserción (IS *Ecp1* e IS *CR1*), integrones y transposones, los cuales se integran en los plásmidos. Se dice que estos genes se han movilizado a partir de *Kluyvera* spp. Los elementos que albergan estos genes, también pueden contener otros como los que codifican betalactamasas AmpC, carbapenemasas y quinolonas (Cantón *et al.,* 2012).

2.3.2 Detección fenotípica de BLEE

2.3.2.1 Método de disco combinado

En el caso de *Klebsiella* y *Escherichia coli*, *P. mirabilis* y *Salmonella,* el CLSI sugiere utilizar discos de una cefalosporina (cefotaxima o ceftazidima) solos y otro con ácido clavulánico. Estos se colocan en agar Mueller-Hinton y si existe una diferencia ≥5 mm entre los diámetros de los discos (el que contiene la cefalosporina sola y el que adicionalmente contiene ácido clavulánico), se deduce que es positivo a la producción fenotípica de BLEE (Figura 4) (Rawat y Nair, 2010). Wiegand *et al.* (2007) determinó que para *E. coli*, esta prueba tiene una sensibilidad de 80% y una especificidad del 100%.

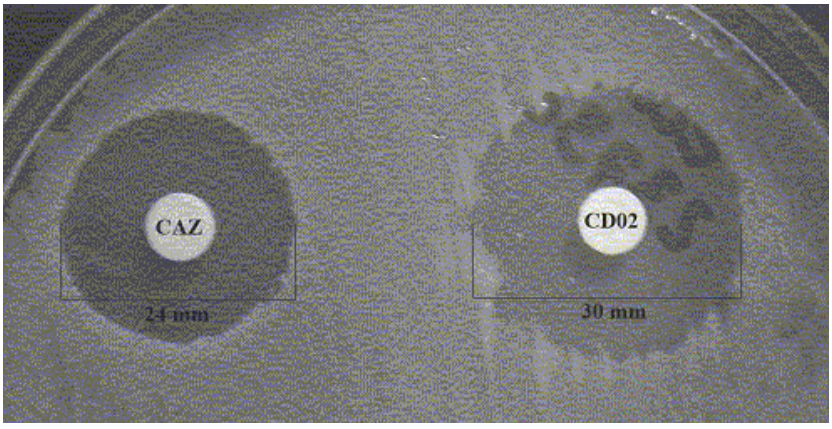


Figura 4. Prueba positiva del disco combinado (Camacho *et al.,* 2004)

CAZ: ceftazidima, CD02: ceftazidima/ácido clavulánico

2.3.2.2 Prueba de sinergia de doble disco

Esta prueba se basa en inocular agar Mueller Hinton con un inóculo estándar, 0.5 en la escala de McFarland. Posteriormente se coloca un disco de cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima o aztreonam y un disco de amoxicilina/ácido clavulánico a 25 - 30 mm de distancia de centro a centro. Se considera positivo a BLEE cuando el halo de inhibición de una de las cefalosporinas se extiende hacia el disco que contiene el ácido clavulánico, produciendo una sinergia que se representa mediante una figura conocida como ¨corcho de champán u ¨ojo de cerradura¨ (Figura 5) (Alvarez,2010; Drieux *et al.,* 2014). Wiegand *et al.* (2007) determinó que para *E. coli*, esta prueba tiene una sensibilidad de 90% y una especificidad del 100%.

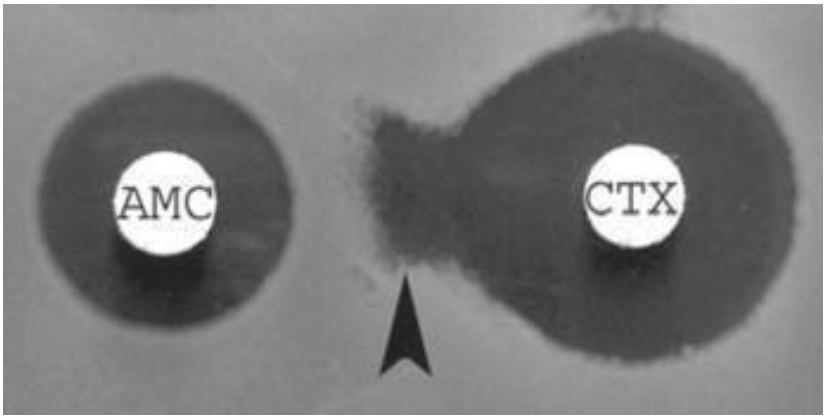


Figura 5. Prueba positiva de sinergia de doble disco (Drieux *et al.,* 2014). AMC:amoxicilina/ácido clavulánico CTX: cefotaxima. Flecha: Zona de inhibición aumentada entre ambos discos.

2.3.2.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante E-test ESBL

Se utilizan tiras de papel que contienen una mitad con una cefalosporina (cefotaxima, ceftazidima o cefepima) con concentración decreciente y la otra mitad igual, pero con ácido clavulánico con una concentración fija. La prueba es considerada positiva cuando la CMI de la cefalosporina en presencia del ácido clavulánico disminuye en tres o más diluciones. Además, al dividir la CIM de la cefalosporina sola entre la cefalosporina/ácido clavulánico es mayor a 8 y al centro de la tira se produce un halo, producto de la sinergia (Figura 6) (Harada *et al.,* 2008). Wiegand *et al.* (2007) determinó que para *E. coli*, esta prueba tiene una sensibilidad de 97.7% y una especificidad del 94.4%.

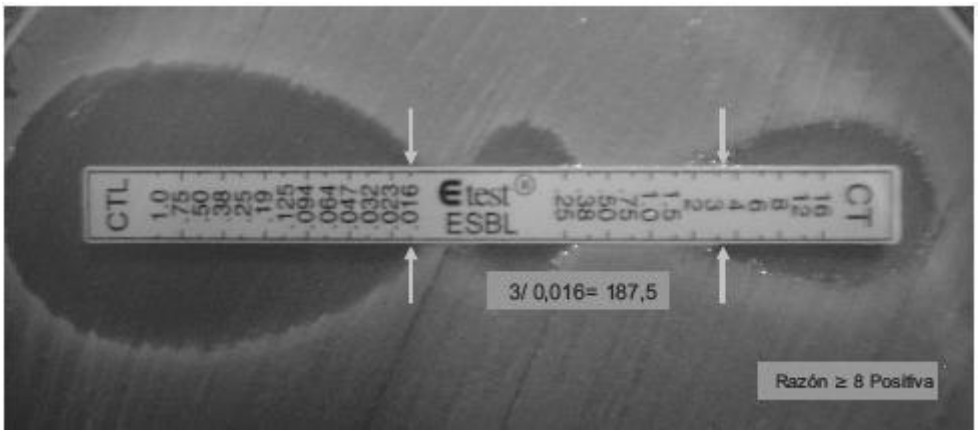


Figura 6. Prueba E-test ESBL positiva (Perozo y Castellano, 2009).

CT: cefotaxima, CTL: cefotaxima/ácido clavulánico.

2.3.3 Detección genotípica de BLEE

A pesar de la existencia de varios métodos fenotípicos para identificar BLEE, estas pruebas toman mucho tiempo y la interpretación no siempre es confiable debido a la gran cantidad de BLEE que existen y su expresión puede ser muy variable (Naas *et al.,* 2010). Es por ello que también se utilizan alternativas para complementar o reemplazar las pruebas fenotípicas tradicionales. Estas pruebas moleculares se basan en la amplificación por PCR y la secuenciación genética, las cuales son más sensibles y específicas que las pruebas fenotípicas. Sin embargo, debido a la gran diversidad genética de las BLEE, sería de gran utilidad un enfoque que permita detectar varios genes a la vez, como por ejemplo los ensayos de *microrrays* (Drieux *et al.*, 2008). No obstante, estas pruebas tienen desventajas como la complejidad de los métodos, el costo de los equipos e instrumentos y la necesidad de un personal capacitado (Castanheira *et al.,* 2021).

2.3.3.1 Reacción en cadena polimerasa (PCR)

La PCR es un método genotípico esencial para identificar genes y subtipos de BLEE. A comparación de los diversos métodos fenotípicos que existen para identificar BLEE, este cuenta con una mayor sensibilidad y especificidad, además tiene un mejor rendimiento y el tiempo de respuesta no es muy largo, lo que ayuda a que el tratamiento adecuado inicie lo más pronto posible (Drieux *et al*., 2008; Deccache *et al.,* 2015). Existen estudios que comparan la evaluación genotípica y fenotípica de BLEE en cepas de *E. coli*, y señalan que la prueba realizada mediante PCR puede tener una mayor sensibilidad y especificidad, llegando a ser de un 100% (Yazdi *et al.*, 2012)

Este método molecular utiliza cebadores específicos para identificar la presencia de genes codificantes de BLEE como TEM, SHV y CTX-M, Sin embargo, esta prueba no puede diferenciar

las variantes de la familia TEM o SHV, ya que muchas veces solo varían en mutaciones puntuales. De manera práctica, se puede utilizar cebadores universales para TEM y SHV para realizar el PCR y posteriormente se debe realizar un secuenciamiento genético con el fin de diferenciar si es BLEE o no BLEE (Sullivan y Diekema, 2016). Se han publicado diversos estudios con cebadores universales para *bla* $_{TEM}$ y *bla* $_{SHV}$ para su detección mediante diferentes tipos de PCR (Nüesch-Inderbinen *et al.,* 1996; Colom *et al.,* 2003; Fang *et al.,* 2008; Hamed *et al.,* 2021).

Por otro lado, familia CTX-M de BLEE puede ser detectada sin problemas mediante PCR usando un cebador universal, aunque también existen cebadores para grupos específicos como CTX-M 1, CTX-M 2, CTX-M 8, CTX-M 9 y CTX-M 25 (Sullivan y Diekema, 2016).

2.4 *Escherichia coli*

2.4.1 Características generales

Escherichia coli es un bacilo gramnegativo anaerobio facultativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Esta bacteria se encuentra habitando el intestino de los animales de sangre caliente, incluyendo humanos. Las cepas de *E. coli* pueden llegar a ser patógenas y causar enfermedades tanto entéricas como extraintestinales en individuos sanos o inmunocomprometidos (Gomes *et al*., 2016; Puño-Sarmiento *et al*., 2013).

Algunas cepas de *E. coli* atacan a especies específicas, sin embargo, otras pueden infectar diversas especies incluyendo humanos. En los seres humanos, *E. coli* puede ser causante de enteritis, infecciones del tracto urinario y sepsis, mientras que en los animales suele ser responsable de enteritis, mastitis y septicemia (McEwen y Collignon, 2018). Gracias a sus variados factores de virulencia, *E. coli* es la bacteria causante de una gran diversidad de enfermedades, principalmente diarrógenas, del tracto urinario, bacteriemia y sepsis. Esta bacteria es una de las más importantes a nivel mundial, además el incremento de RAM de *E. coli*, causa aumento de mortalidad, morbilidad, costos sanitarios y sociales (Poolman *et al.*, 2023). Las cepas de *E. coli* productoras de BLEE pueden transmitirse de humano a humano o de animales a humanos mediante la alimentación, por lo que la carga de estas cepas a nivel de las granjas tiene una gran importancia debido a su potencial fuente de reservorio, para lo cual se requiere un enfoque de Una Salud (*One Health*). Las infecciones producidas por estas cepas causan una mayor mortalidad debido a la mayor tasa de mortalidad relacionada al tratamiento antibiótico ineficaz provocado por la RAM (Ramos *et al.,* 2020)

2.4.2 Patotipos

Dependiendo de los factores de virulencia adquiridos, las cepas de *E. coli* se agrupan en diferentes grupos conocidos como patotipos. Colectivamente se le conoce como *E. coli* diarreogénica (DEC), la cual se clasifica en diferentes patotipos según sus factores de virulencia, mecanismos de patogenicidad, signos clínicos, consecuencias, prevalencia global y preferencia del hospedero. Actualmente se conocen 7 patotipos de DEC, los cuales son *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* productora de Shiga toxina (STEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* adherente difusa (DAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* necrotoxigénica (NTEC) (Farfán-García *et al*., 2016; Gomes *et al*., 2016; Jesser y Levy, 2020; Kaper *et al*., 2004; Nagy y Fekete, 2005; Marks *et al.,* 2011). A continuación, se detallarán los patotipos más descritos en literatura:

2.4.2.1 *E. coli* enteropatógena (EPEC)

Este término fue utilizado por primera vez para describir unas cepas que estaban relacionadas a brotes de diarrea infantil entre 1940 y 1950 (Bray, 1945). Estas cepas tienen la particularidad de producir diarrea en el hospedero, no puede producir Shiga toxinas ni enterotoxinas termolábiles o termoestables y en la histopatología se observa un tipo de lesión llamada unión y borrado o adherencia y eliminación (A/E), la cual hace referencia a que luego de adherirse a los enterocitos, causan la eliminación de las microvellosidades intestinales (Nataro y Kaper, 1998; Vidal *et al.,* 2007). Este tipo de cepas se dividen en EPEC típica (tEPEC) y EPEC atípica (aEPEC), cuya diferencia es que la primera posee un plásmido del factor de adherencia, el cual codifica las fimbrias (Trabulsi *et al*., 2002). No es muy común encontrar cepas de tEPEC en animales, en cambio, sí se han reportado cepas aEPEC en animales sanos y enfermos con signos clínicos de diarrea (Hernandes *et al.*, 2009)

2.4.2.2 *E. coli* productora de Shiga toxina (EHEC / STEC)

Este grupo tiene la capacidad de producir citotoxinas de la familia Stx, lo cual representa su principal factor de virulencia. En humanos, principalmente niños y lactantes, se han reportado casos de diarrea, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico e insuficiencia renal aguda (Melton-Celsa, 2014). Uno de los factores claves asociados a su patogénesis es la capacidad de adhesión a las células epiteliales intestinales (Stevens y Frankel, 2014). Estas cepas se encuentran distribuidas en el tracto gastrointestinal de diferentes animales como bovinos (González *et al.,* 2016), porcinos (Borges *et al.,* 2012), ovinos (Martins *et al.*, 2015), aves (Gioia-Di *et al*., 2016) y peces (Ribeiro *et al.*, 2015), lo cual indica su gran potencial zoonótico.

2.4.2.3. *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)

Este patotipo se caracteriza por ser una de las principales causas de enfermedades diarreicas tanto en el hombre como en animales de granja principalmente recién nacidos como terneros o lechones. En los humanos predomina por provocar diarreas infantiles que pueden llegar a ser mortales y también está asociada a la diarrea del viajero. En el caso de los animales, es conocida por causar colibacilosis, enfermedad entérica que ataca a lechones lactantes y post destete. Sus principales factores de virulencia son las adhesinas, que les permiten unirse al epitelio del intestino delgado, y las enterotoxinas, que modifican los enterocitos y provocan que la secreción aumente, mientras que la absorción se ve disminuida (Nagy y Fekete, 2005).

2.4.2.4. *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

Esta cepa se distingue por mostrar el AA en células epiteliales pero que no tiene los marcadores genéticos característicos de otros patotipos (Navarro-García y Elías, 2011). Se ha reportado que este tipo de diarrea tiene características acuosas, mucosas con o sin sangre, además causa dolor abdominal, vómitos y fiebre baja (Hebbelstrup *et al.*, 2014). Este patógeno afecta principalmente a niños y adultos y su transmisión se da principalmente mediante la vía fecal-oral a través de alimentos o agua contaminada. No se ha encontrado relación entre las cepas aisladas en humanos y animales, por lo que se sugiere que estos últimos podrían no significar un reservorio para los humanos (Uber *et al.*, 2006).

2.4.2.5 *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

Este patotipo infecta el intestino grueso mediante la invasión a los enterocitos por endocitosis, causando su destrucción (Levine, 1987). Las cepas EIEC tienen características muy similares a la especie *Shigella*, lo cual hace tediosa su identificación (Silva *et al.*, 1980). Esta cepa es causante de la disentería en los humanos, principalmente en los países en desarrollo (Trabulsi *et al*., 1985).

2.4.3 Enfermedades en los cerdos causadas por *E. coli*

2.3.3.1 Colibacilosis entérica

2.4.3.1.1 Epidemiología

E. coli es el agente causante de varias enfermedades en los cerdos, incluyendo a la diarrea neonatal y la diarrea post-destete. Ambas enfermedades afectan a los porcinos tanto lactantes como destetados, causando importantes pérdidas económicas debido a la alta tasa de mortalidad y morbilidad, gastos en tratamientos, vacunas, suplementos y disminución del peso de los lechones (Barros *et al.,* 2023)

Se ha reportado que la mortalidad causada por la colibacilosis porcina alcanza hasta el 70% en lechones recién nacidos que presentan diarrea acuosa y hasta 25% en porcinos con diarrea grave o severa que no han recibido tratamiento. Esta enfermedad se encuentra distribuida tanto en países industrializados como en países en desarrollo, así como en diferentes tipos de climas como templados y tropicales (Fairbrother *et al.,* 2019).

Esta infección es causada específicamente por el patotipo ETEC, el cual s ha demostrado que se puede encontrar presente en cerdos sin diarrea y también pueden eliminarse a través de ellos mismos (Luppi, 2017). Las cepas de *E. coli* ETEC pueden estar presentes en piensos de comida, de agua, suelo y otros lugares de la granja que pueden estar contaminados con las heces. Además, factores como la baja temperatura y la humedad permiten que dichas cepas tengan periodos prolongados de sobrevivencia (Fairbrother *et al.,* 2019)

2.4.3.1.2 Factores de virulencia y patogenia de ETEC

La patogenicidad de *E. coli* esta mediada por factores de virulencia como las adhesinas, proteínas de superficie conocidas como fimbrias, las cuales permiten que ETEC pueda adherirse a sus receptores que se encuentran en los bordes en cepillo de los enterocitos del intestino delgado. Dichas fimbrias, encontradas en los cerdos, se clasifican en cinco tipos, los cuales son los siguientes: F4 (K88), F5 (K99), F41, F6 (987P) y F18. Los 4 primeros tipos están asociados a la adhesión en la colibacilosis neonatal, mientras que, la F18 está relacionada a la colibacilosis post destete, así como la F4. Estas cepas de ETEC también producen enterotoxinas, las cuales se dividen principalmente en la toxina termoestable (ST), la toxina termolábil (LT) y la toxina termoestable enteroagregativa (EAST1). La primera se divide en Sta y Stb, mientras que la segunda se divide en LTI y LTII (Luppi, 2017; Castro *et al.,* 2022; Barros *et al.,* 2023)

La infección se lleva a cabo mediante la ingesta oral de la ETC, pasando por el estómago y finalmente llegando al intestino, en donde la ETEC prolifera y mediante la unión de las fimbrias a los receptores del epitelio, coloniza el intestino delgado. Posteriormente se produce la liberación de endotoxinas, las cuales estimulan la secreción de sustancias como agua y electrolitos en la luz del intestino, lo cual causa diarreas, disminución de peso y finalmente la muerte (Figura 7) (Barros *et al.,* 2023)

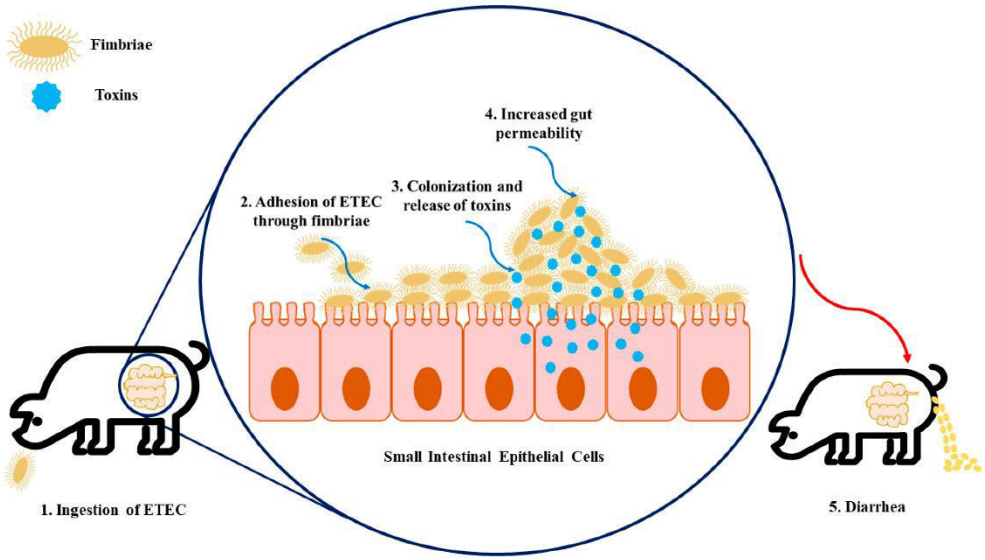


Figura 7. Infección intestinal por *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) (Barros *et al.,* 2023)

Otro patotipo asociado a la diarrea post destete es EPEC, el cual no se une mediante fimbrias, presentan un sistema de secreción que inyecta proteínas en el enterocito del hospedero, provocando una adherencia de la bacteria al epitelio intestinal, mecanismo conocido como adherencia y borrado (AE). Las EPEC de las diferentes especies animales poseen ua variante de la proteína de membrana AE (Fairbrother *et al.,* 2019).

2.4.3.1.3 Signos clínicos y lesiones

La diarrea neonatal se puede observar en lechones de 0 a 4 días de nacidos, principalmente en las crías de cerdas que paren por primera vez. Se suele presentar abundantes diarreas de color blanco o amarillo con una consistencia acuosa o cremosa cuyo olor es particular (Luppi, 2017).

La diarrea post destete se suele presentar en cerdos de 2-3 semanas luego del destete, aunque también se han reportado casos entre las 6 y 8 semanas. Se observa gran cantidad de diarrea de color amarrillo o rosado de consistencia acuosa que perdura por un periodo aproximado de una semana (Luppi, 2017).

Los animales infectados suelen tener algunos signos como depresión, disminución o falta de apetito. Se pueden producir muertes súbitas al inicio y los cerdos que mueren normalmente se encentran con signos de deshidratación. En la necropsia se observan algunas lesiones que, a pesar de no ser patognomónicas, nos pueden indicar en conjunto una infección por colibacilosis. Dichas lesiones incluyen el intestino delgado dilatado, edematoso e hiperémico, estómago con contenido, mucosa gástrica hiperémica y ganglios linfáticos mesentéricos agrandados e hiperémicos (Fairbrother *et al.,* 2019).

2.4.3.1.4 Diagnóstico

Uno de los enfoques utilizados para el diagnóstico es la selección de animales que presenten diarrea recientemente, sacrificarlos y realizar la necropsia para evaluar lesiones y posteriormente enviar muestras de intestino para su evaluación bacteriológica. Esto también se puede realizar con animales que hayan fallecido, sin embargo, la autólisis de los tejidos del intestino no va a permitir la correcta evaluación. En caso no se tengan animales muertos o con signos clínicos, se pueden tomar muestras de heces directamente del animal o hisopados rectales. Como estudio complementario se puede realizar la histopatología, en donde se puede observar la adherencia de las fimbrias a la membrana del borde en cepillo de los enterocitos, así como congestión vascular, abundantes células inflamatorias, atrofia de las vellosidades, entre otros. Sin embargo, el diagnóstico definitivo se basa en la detección de los genes que codifican las toxinas (STa, STb, LT y EAST1 y las fimbrias F4, F5, F6, F18, F41 de *E. coli* ETEC mediante la técnica de PCR (Luppi, 2017; Fairbrother *et al.,* 2019).

2.4.3.1.5 Tratamiento

El tratamiento usado para las diarreas en porcinos se suele realizar principalmente con antibióticos, sin embargo, es muy importante confirmar el diagnóstico mediante las pruebas ya mencionadas y realizar el test de susceptibilidad antimicrobiana. Los antibióticos más usados en estos casos son ampicilina, gentamicina, neomicina, estreptomicina, entre otros. Además, se puede usar fluidoterapia y glucosa para reponer las pérdidas por las diarreas (Luppi, 2017).

2.4.3.1.6 Prevención y control

La prevención y control de esta enfermedad se basa en las medidas estrictas higiénicas, estrategias para reducir la carga de *E. coli*, el aumento de inmunidad tanto en cerdas como en los lechones y el implemento de una buena bioseguridad en la granja (Luppi, 2017; Fairbrother *et al.,* 2019).

Dentro de las medidas de higiene en los ambientes es importante la desinfección entre partos, el uso de pisos perforados para que las heces caigan, una buena ventilación para evitar que la humedad aumente y predisponga la proliferación de *E. coli*. Además, también es importante regular la temperatura de los lechones, ya que la baja temperatura también predispone la colibacilosis (Fairbrother *et al.,* 2019).

Una de las medidas de prevención más importantes es la vacunación de la madre. Existen vacunas comerciales bacterianas, que producen los antígenos fimbriales, y vacunas fimbriales con o sin toxina LT (Zhang, 2014; Fairbrother *et al.,* 2019).

2.3.1.2 Enfermedad de los edemas

2.4.3.1.1 Epidemiología

La Enfermedad de los Edemas (EE) es una patología distribuida a nivel mundial considerada fatal que afecta e los porcinos que se encuentran en etapa de crecimiento, principalmente durante el destete y engorde. La cepa de *E. coli* causante de esta enfermedad es conocida como *E. coli* shigatoxigénica (STEC), *E coli* productora de verotoxina (VTEC) y *E. coli* enfermedad del edema (EDEC) (Tabaran y Tabaran, 2019). Provoca una elevada mortalidad entre los cerdos afectados, así como grandes pérdidas económicas (García-Sánchez *et al.,* 2020). Se han reportado tasas de mortalidad de 50% a más del 90%, teniendo la enfermedad una duración entre 4 y 14 días, además de ser recurrente en el mismo lugar (Tabaran y Tabaran, 2019).

2.4.3.1.2 Factores de virulencia y patogenia de EDEC

La enfermedad de los edemas tiene una serie de factores de virulencia que en conjunto causan la colonización intestinal y la multiplicación de las STEC, además de toxinas causantes de daño vascular. Las adhesinas son unos de estos factores, permiten la colonización intestinal mediante las fimbrias F18 y F4 (K88). Por otro lado, la toxina Shiga 2e (Stx2e) es el principal factor de virulencia que actúa en las células endoteliales, es la responsable de los procesos vasculares (Tabaran y Tabaran, 2019).

Luego de que STEC ingresa vía oral, se adhiere al intestino, en donde se produce la secreción de la toxina Stx2e, la cual se absorbe por la mucosa intestinal y pasa a través de la barrera intestinal, distribuyéndose así vía hematógena. Los mecanismos que usa esta toxina para provocar daño celular son la inhibición de la síntesis de proteínas celulares mediante la inactivación de los ribosomas, la alteración de la función de los ribosomas y la unión a receptores Gb (involucrado en la remodelación del citoesqueleto entre otras funciones) que se encuentran en distintas células como por ejemplo los glóbulos rojos. Debido a su distribución sistémica, se pueden observar daños en diferentes órganos como angiopatía degenerativa, edema gástrico, subcutáneo, mesentérico y encefálico causado por el aumento de permeabilidad vascular e incluso se pueden llegar a presentar problemas neurológicos (Figura 8) (Moredo *et al.,* 2012; Lillie *et al.,* 2018, Tabaran y Tabaran, 2019).

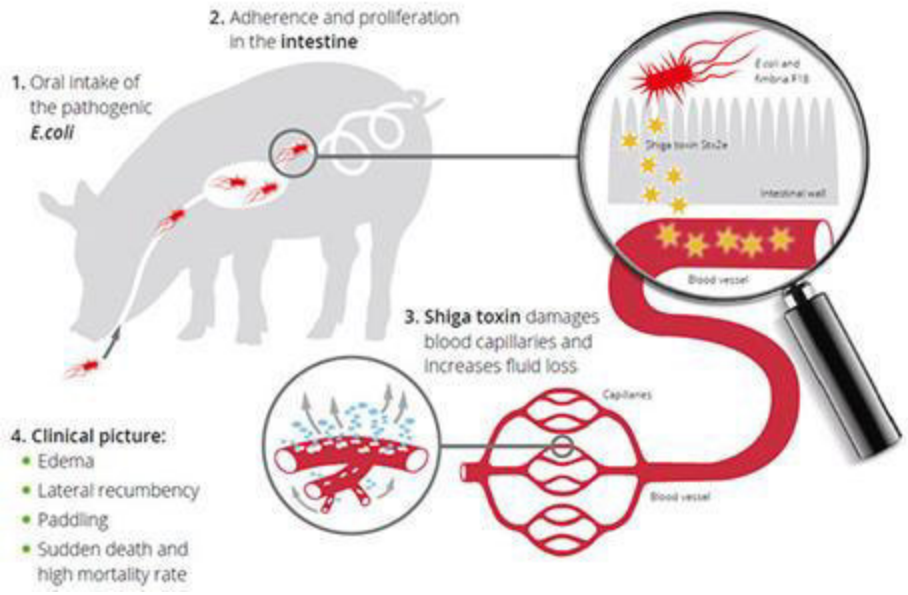


Figura 8. Infección por *E. coli* productora de shiga Toxina (Zimmerman *et al.*, 2012).

2.4.3.1.3 Signos clínicos y lesiones

La EE se presenta generalmente durante las primeras semanas posterior al destete, puede iniciar con la muerte súbita de algunos cerdos y otros con inapetencia. Los signos neurológicos que se pueden observar de forma aguda son depresión, inestabilidad al caminar y temblores. Además, algunos cerdos pueden estar decúbito lateral, presentar disnea, incluso convulsiones, músculos rígidos, parálisis y posteriormente la muerte, la cual se da usualmente dentro de las 24 horas desde el inicio de los signos clínicos. Asimismo, uno de los signos más comunes son los edemas en diferentes grados tanto en los párpados, como en la laringe y en la frente. En algunos casos, generalmente en la fase terminal de la enfermedad, también se reportan diarreas con presencia de coágulos de sangre fresca (Tabaran y Tabaran, 2019; Fairbrother *et al.,* 2019).

Dentro de las lesiones halladas post mortem se puede observar edema vascular difuso, junto con petequias. El edema se suele encontrar a lo largo de todo el sistema digestivo, piel y ganglios linfáticos. En algunos casos también se observa gastroenteritis hemorrágica y algunas lesiones en el sistema respiratorio. El cerebro no presenta muchos cambios macroscópicos, sin embargo, se ha reportado congestión meníngea, petequias y edema cerebral. La lesión microscópica asociada a EE es la angiopatía degenerativa en arterias y arteriolas con edema en tejidos circundantes (Tabaran y Tabaran, 2019; Fairbrother *et al.,* 2019).

2.4.3.1.4 Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad inicia con la identificación de los signos neurológicas y la presencia de edema en lechones post destete, además de la muerte súbita. Sin embargo, el

diagnóstico definitivo se basa en la observación de lesiones post mortem, la histopatología y la identificación del agente causal, la cual incluye el aislamiento de la *E. coli* y la detección genética de la fimbria F18 y la toxina St2e mediante la amplificación por PCR (Tabaran y Tabaran, 2019; Fairbrother *et al.,* 2019).

2.4.3.1.5 Tratamiento

Los antibióticos se siguen usando como tratamiento de esta enfermedad, sin embargo, cuando ya se observan signos neurológicos, hay pocas posibilidades de obtener un resultado favorecedor. Los antibióticos elegidos deben tener acción en el intestino como amoxicilina/ácido clavulánico, fluoroquinolonas, cefalosporinas, neomicina o trimetoprima y cabe recalcar que se deben usar siempre y cuando se haya realizado una prueba de susceptibilidad ya que su uso indiscriminado aumenta la resistencia antimicrobiana (Fairbrother *et al.,* 2019).

2.4.3.1.6 Prevención y control

Las medidas preventivas con respecto a la bioseguridad e higiene de las instalaciones son muy similares a las descritas en la colibacilosis porcina. Estas incluyen la limpieza y desinfección de todas las instalaciones, además del sistema de agua. El manejo de los cerdos destetados debe ser libre de estrés y evitando el contacto innecesario entre diferentes camadas (Fairbrother *et al.,* 2019).

Otro método preventivo que se puede utilizar en algunos países es la vacuna. A nivel comercial existen vacunas para las madres, vacunas vivas bivalentes F4 y F18 y vacunas con el antígeno Stx2e para los lechones (Fairbrother, 2023)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de ejecución y periodo de duración

El presente estudio se desarrolló en el laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Sección Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV - UNMSM) durante los meses de julio - diciembre del año 2022.

3.2 Descripción del material experimental

Para este estudio se emplearon 186 aislados del cepario del Laboratorio de Microbiología Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, las cuales corresponden a un estudio previo (Lyme, datos no publicados), dichas muestras fueron recolectadas de 4 granjas tecnificadas de Lima y fueron obtenidas de manera aleatoria mediante hisopados rectales individuales de lechones sin diarrea de 0 a 50 días de edad en el año 2019 y posteriormente se realizó un cultivo para seleccionar las que presentaban *Escherichia coli*. Luego de realizar las pruebas confirmatorias, fueron criopreservadas en caldo de cultivo Tripticasa de Soya (TSB) con glicerol al 20% en microviales de 1.5ml, a -20 °C.

3.3 Materiales y equipos

3.3.1 Material Biológico

- Aislados de *Escherichia coli*
- Controles positivos:
    - Cepa EC 237k (Alvarez *et al.,* 2022)
    - Cepa EC 247K (Alvarez *et al.,* 2022)

    - Cepa E213
    - Cepa E217
- Control negativo:
    - Cepa ATCC 25922 *E. coli*

3.3.2 Materiales y equipos de laboratorio

- Bloque de calor
- Estufa (Rango de T° hasta 60°)
- Vortex
- Refrigeradora (4°C)
- Termociclador
- Cámara de flujo laminar (DNA/RNA) UV
- Congeladora (-20°C)
- Equipo de electroforesis)
- Microcentrífuga
- PCR Cooler Eppendorf
- Gradillas
- Viales estériles de 1.5ml, 0.5ml y 0.2ml Eppendorf
- Micropipetas de 1000, 100 y 10 µl Eppendorf
- Punteras de micropipeta estériles de 1000, 100 y 10 µl. Eppendorf
- Transiluminador SafeVIEW
- Agitador de laboratorio
- Guantes de nitrilo
- Mascarillas

3.3.2 Reactivos

- Kit de extracción de ADN
- DNTPs
- *Taq* polimerasa *Dreamtaq*
- Buffer + $MgCl_2$ *Dreamtaq*
- Buffer *Promega*
- $MgCl_2$ *Promega*
- Cebadores Macrogen Inc (Cuadro 1)
- Agua grado molecular- libre de nucleasas
- UltraPure 10X TBE Buffer

- Agarosa SIGMA Aldrich
- Marcador de peso molecular 100bp Opti-DNA Marker
- Buffer de carga Safe green ABM
- Buffer TBE (Tris-Borato-EDTA)

3.4 Metodología

3.4.1 Reactivación de aislados

Los aislados de *Escherichia coli* utilizados en este estudio, fueron inoculados en viales de 100 µl con caldo de Tripticasa de soya y luego fueron incubados a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, este caldo fue sembrado en Agar MacConkey mediante la técnica de agotamiento y finalmente fue incubado a 37 °C por 24 horas (Sánchez y Corrales, 2015). Luego de ese tiempo, se seleccionaron dos colonias del crecimiento obtenido en el agar, las cuales se inocularon en 1.5 ml de caldo Luria-Bertani (LB) y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Pasado ese tiempo, se observó el vial con turbidez, lo cual significa que existe crecimiento bacteriano.

3.4.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando el kit de extracción de ADN GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, EE. UU) procedimiento que se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 2). El ADN extraído se conservó en viales a una temperatura de -20ºC. Se realizó la cuantificación de viales aleatorios con ayuda de un espectrofotómetro.

3.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa

La detección de genes de resistencia BLEE (*bla*$_{CTX-M,}$ *bla*$_{SHV}$ y *bla*$_{TEM}$) se llevó a cabo mediante el método de PCR convencional. Para ello, se utilizaron cebadores por cada gen (Cuadro 1) y el protocolo descrito por Marrero-Moreno *et al,* (2017) para realizar la estandarización (Cuadro 2, Cuadro 3 y Cuadro 4), además se usó el Termociclador Biometra Tone (Analytik Jena) para realizar el procedimiento. Se tuvo una mezcla de reacción para cada gen con un volumen final de 20 µl (Cuadro 5).

Como control positivo se usaron aislados del cepario del laboratorio. Para *bla*$_{TEM}$, se utilizó la cepa EC237k (Alvarez *et al.,* 2022); para *bla*$_{SHV}$, las cepas E213 y E217, controles aislados de hisopados rectales caninos usados en otro trabajo de investigación; y, para *bla*$_{CTX-M}$, la cepa EC247k (Alvarez *et al.,* 2022). En el caso de los controles negativos, se utilizó la cepa ATCC 25922 *E. coli.* Como blanco, se utilizó una mezcla de reacción con todos los ingredientes a excepción del ADN, en su lugar, se añadió agua ultrapura.

Cuadro 1. Secuencia y tamaño de producto de los cebadores *bla*$_{TEM}$, *bla*$_{CTX-M}$ y *bla*$_{SHV}$.

Cebador	Secuencia	Producto	Referencia
bla$_{TEM}$ *forward*	5' - ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG - 3'	859 pb	Aarestrup *et al*., 2003
bla$_{TEM}$ *reverse*	5' - ACC AAT GCT TAA TCA GTG AG - 3’		
bla$_{CTX-M}$ *forward*	5’ - CGA TGT GCA GTA CCA GTA A - 3’	585 pb	Belaaouaj, 1994.
bla$_{CTX-M}$ *reverse*	5’ - TTA GTG ACC AGA ATC AGC GG - 3’		
bla$_{SHV}$ *forward*	5' - TTA TCT CCC TGT TAG CCA CC - 3'	864 pb	Hasman *et al*., 2005
bla$_{SHV}$ *reverse*	5’ - GAT TTG CTG ATT TCG CTX GG - 3’		

Cuadro 2. Protocolo de amplificación por PCR para la detección de *bla*$_{TEM}$ basado en Marrero - Moreno *et al* (2017)

Fase	Temperatura	Tiempo
Predesnaturalización	94 °C	7 minutos
Desnaturalización	94 °C	30 segundos x 35 ciclos
Hibridación	57 °C	45 segundos
Extensión	72 °C	45 segundos
Extensión Final	72 °C	7 minutos

Cuadro 3. Protocolo de amplificación por PCR para la detección de *bla*$_{SHV}$ basado en Marrero - Moreno *et al* (2017)

Fase	Temperatura	Tiempo
Predesnaturalización	95 °C	5 minutos
Desnaturalización	94 °C	1 minuto x 30 ciclos
Hibridación	55 °C	1 minuto
Extensión	72 °C	1 minuto
Extensión final	72 °C	10 minuto

Cuadro 4. Protocolo de amplificación por PCR para la detección de *bla*$_{CTX-M}$ basado en Marrero - Moreno *et al* (2017)

Fase	Temperatura	Tiempo
Predesnaturalización	95 ℃	5 minutos
Desnaturalización	94 ℃	30 segundos x 30 ciclos
Hibridación	60 ℃	30 segundos
Extensión	72 ℃	1 minuto
Extensión final	72 ℃	5 minutos

Cuadro 5. Mezcla de reacción con un volumen final de 20uL para cada gen.

	bla$_{CTX-M}$ concentración* (volumen)	, *bla*$_{SHV}$ concentración* (volumen)	*bla*$_{TEM}$ concentración* (volumen)
Buffer	1X (4 µL)	1X / 2 mM (2 µL)	1X (4 µL)
$MgCl_2$	1.25 mM (1 µL)		1.5 mM (1.2 µL)
dNTPs	0.2 mM (0.4 µL)	0.2 mM (0.4 µL)	0.2 mM (0.4 µL)
Cebador	0,5 µM (0.4 µL)	0,25 µM (0.2 µL)	0,5 µM (0.4 µL)
Taq polimerasa	1 U (0.2 µL)	1 U (0.2 µL)	1 U (0.2 µL)
ADN	20-50 ng/ µL (1 µL)	20-50 ng/ µL (1 µL)	20-50 ng/ µL (1 µL)
Agua libre de nucleasas	13 µL	16.2 µL	12.8 µL

*Las concentraciones de los reactivos presentadas en el cuadro hacen referencia a la concentración final en el tubo de reacción.

3.4.4 Electroforesis

El producto de amplificación se analizó mediante la electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % a 90 voltios por 90 minutos en una solución tampón TBE al 0.5X. Se utilizó el buffer de carga *Safe Green* ™ junto con los productos del PCR a razón de 1: 5 µl, para luego colocarlos en los pocillos del gel. Adicionalmente se utilizó un marcador de peso molecular 100bp Opti DNA Marker. Finalmente, los resultados se observaron mediante un transiluminador SafeVIEW de luz azul.

IV. RESULTADOS

Luego de realizar la reactivación y la extracción de ADN, se realizó una cuantificación aleatoria en donde se obtuvieron resultados de 20-50 ng/ml, lo cual nos indicaba la concentración adecuada de ADN para proceder con el PCR. En el presente estudio se obtuvieron las frecuencias para los genes de resistencia *bla*$_{TEM,}$ *bla*$_{CTX-M}$ y *bla*$_{SHV.}$ Del total de 186 cepas, el 69.89% (130/186) presentaron al menos uno de los 3 genes detectados en el presente estudio. El gen con mayor frecuencia fue *bla*$_{TEM}$ con 66.7% (124/186), seguido del gen *bla*$_{CTX-M}$ con 13.44% (25/186). Mientras que ninguna cepa fue positiva para el gen *bla*$_{SHV}$. Además, el 9.7% (18/186) de las muestras, amplificaron tanto el gen *bla*$_{TEM}$, como el gen *bla*$_{CTX-M}$. (Cuadro 5). En cuanto al gen *bla*$_{CTX-M,,}$ se distribuyó en 44% (11/25), 12% (3/25), 44% (11/25) y 0% (0/25) en las granjas muestreadas (Anexo 6). Y los resultados de *bla*$_{TEM}$ se distribuyeron en 27.4% (34/124), 16.9% (21/124), 29% (36/124) y 26.6% (33/124). (Anexo 7).

Cuadro 6. Frecuencia a genes de resistencia antimicrobiana (*bla*$_{TEM}$, *bla*$_{CTX-M}$ y *bla*$_{SHV}$)

	bla$_{TEM}$	*bla*$_{CTX-M}$	*bla*$_{SHV}$	*bla*$_{TEM}$ y *bla*$_{CTX-M}$
Nº de cepas positivas / Total	124/186	25/186	0/186	18/186
% de cepas positiva	66.7	13.44	0	9.7%

Estos resultados fueron obtenidos a partir de la visualización de los productos del PCR de los genes de resistencia *bla*$_{TEM}$ (Figura 9), *bla*$_{SHV}$ (Figura 10) y *bla*$_{CTX-M}$ (Figura 11) mediante la electroforesis en gel de agarosa.

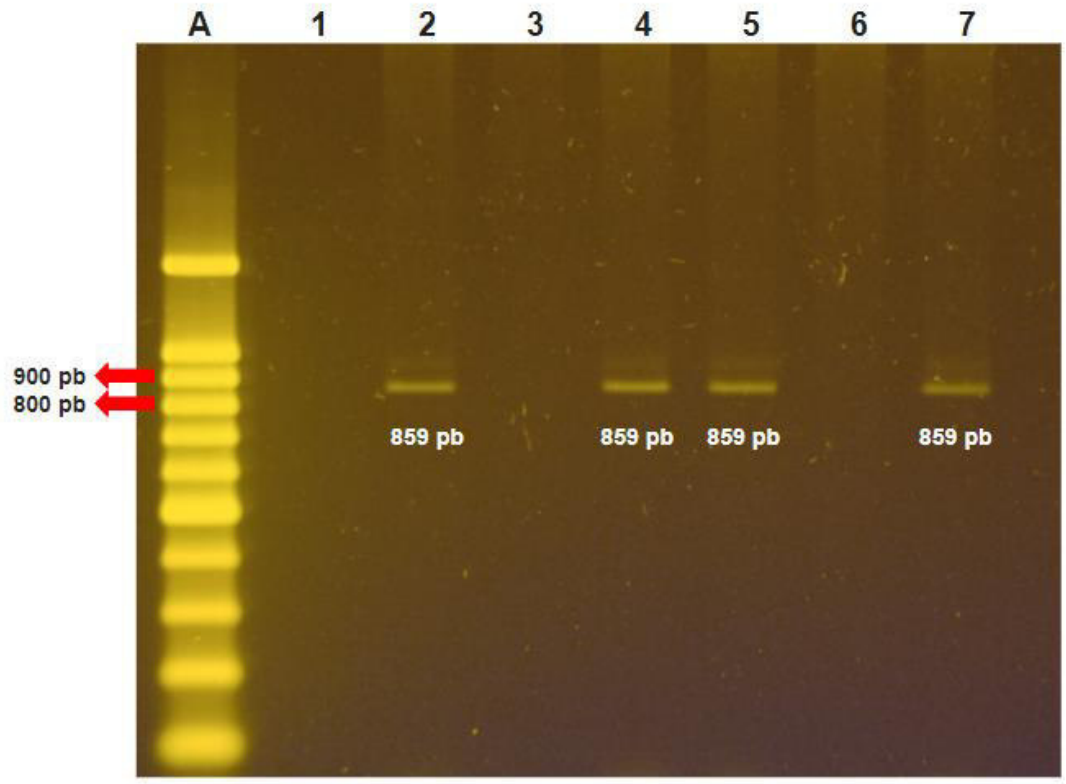


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la ampliación del gen *bla*$_{TEM}$ (859 pb). **Carril A**: marcador de peso molecular de 100 pb. **Carril 1**: Blanco de reacción. **Carril 2**: Control positivo EC237k. **Carril 3:** Control negativo cepa ATCC 25922 *E. coli.* **Carril 4:** Muestra EC 387 positiva para el gen *bla*$_{TEM}$. **Carril 5:** Muestra EC 402 positiva para el gen *bla*$_{TEM}$. **Carril 6:** Muestra EC 394 negativa para el gen *bla*$_{TEM}$. **Carril 7:** Muestra EC 362 positiva para el gen *bla*$_{TEM}$

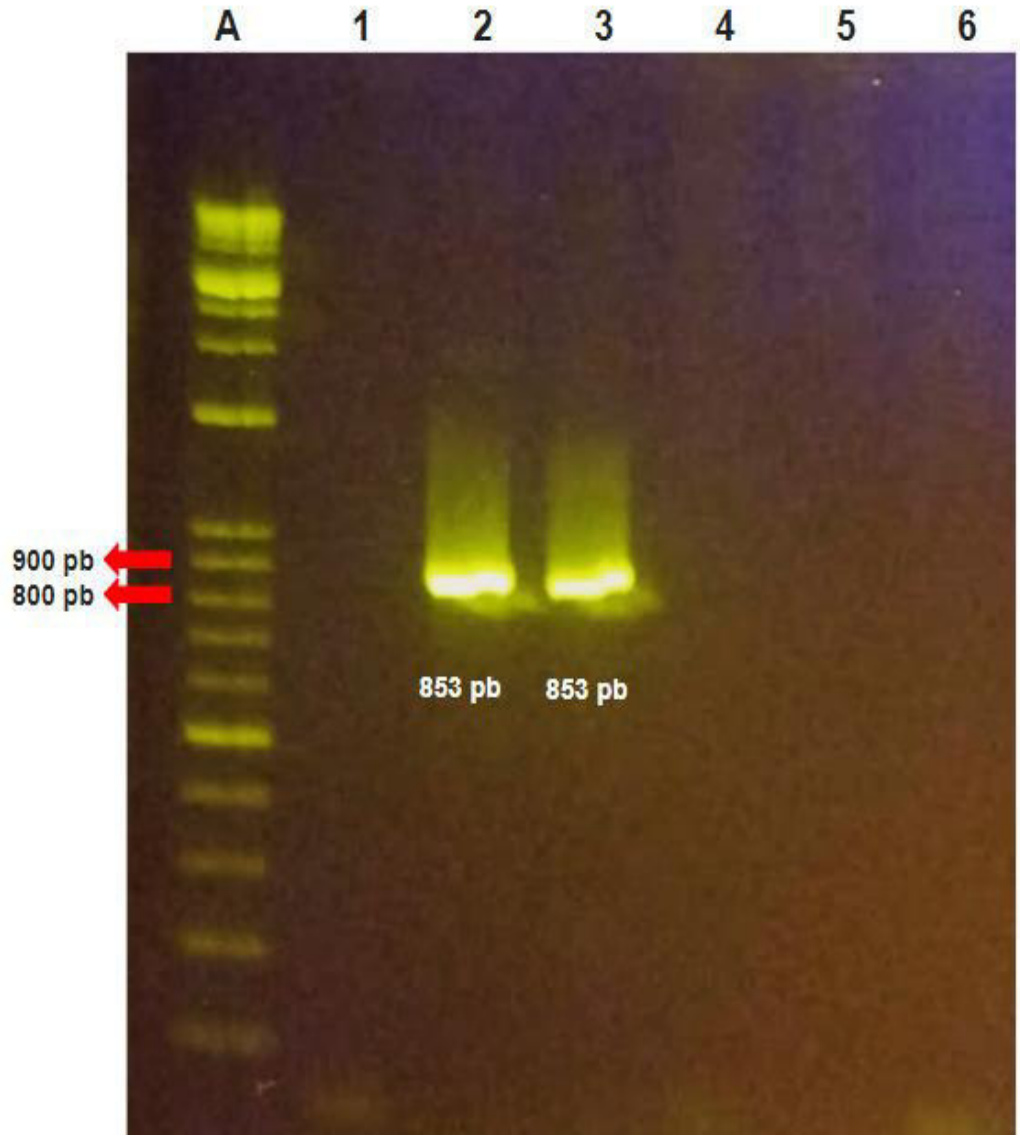


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la ampliación del gen *bla*$_{SHV}$ (853 pb). **Carril A**: marcador de peso molecular de 100 pb. **Carril 1**: Blanco de reacción. **Carril 2**: Control positivo E213. **Carril 3:** Control positivo E217. **Carril 4:** Control negativo cepa ATCC 25922 *E. coli* **Carril 5:** Muestra EC 209 negativa para el gen *bla*$_{SHV}$. **Carril 6:** Muestra EC 246 negativa para el gen *bla*$_{SHV.}$

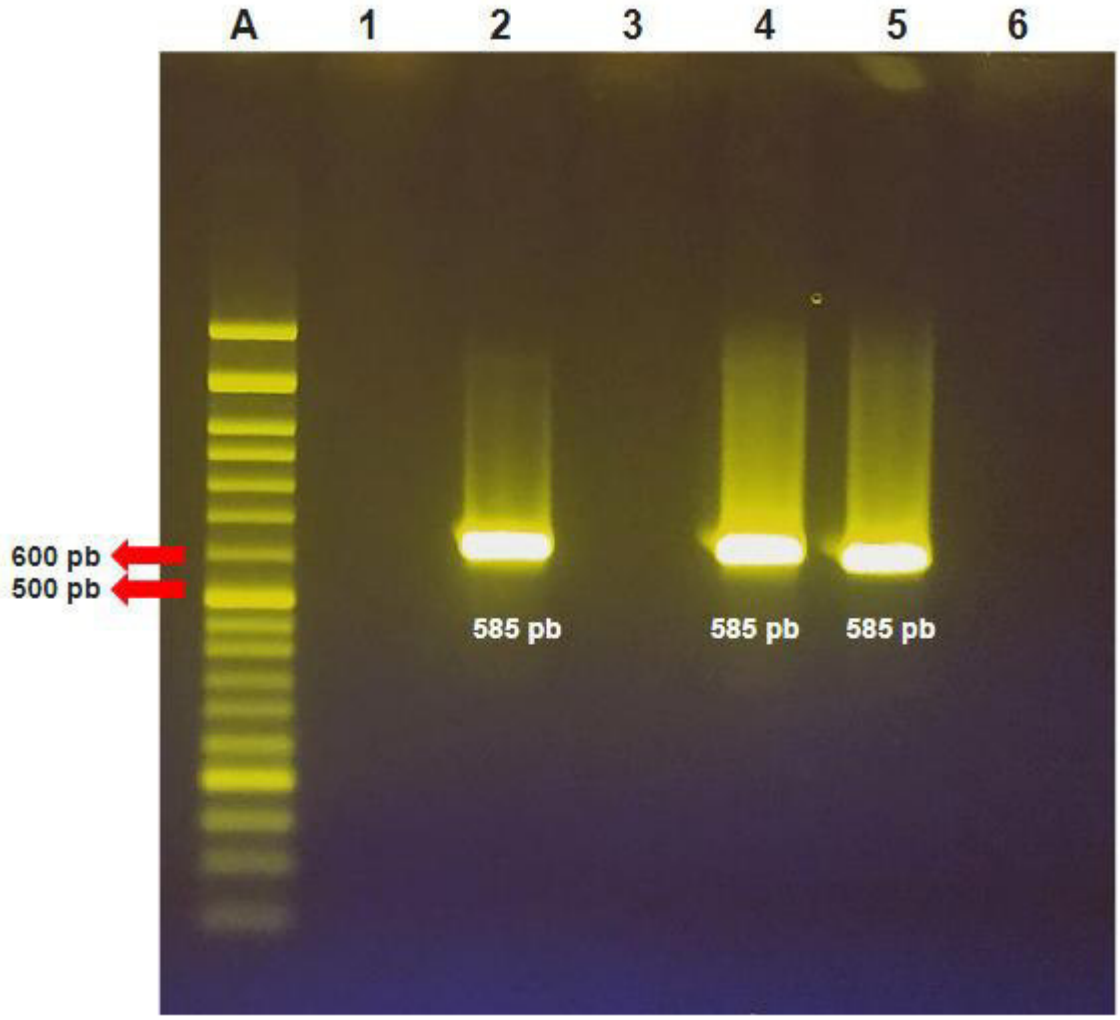


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la ampliación del gen *bla* $_{CTX\text{-}M}$ (585 pb). **Carril A**: marcador de peso molecular de 100 pb. **Carril 1**: Blanco de reacción. **Carril 2**: Control positivo EC247k. **Carril 3:** Control negativo cepa ATCC 25922 *E. coli*. **Carril 4:** Muestra EC 271 positiva para el gen $bla_{CTX\text{-}M}$. **Carril 5:** Muestra EC 303 positiva para el gen $bla_{CTX\text{-}M}$. **Carril 6:** Muestra EC 260 negativa para el gen $bla_{CTX\text{-}M.}$

V. DISCUSIÒN

La OMS, en el año 2019, declaró a la RAM como una de las 10 principales amenazas mundiales para la salud pública que enfrenta la humanidad. Se calcula que para el año 2050, el número de muertes al año será de 10 millones y en Latinoamérica será de 392.000 a causa de la RAM si es que no se realiza la vigilancia correspondiente (O'Neil, 2014). Además, una de las principales bacterias en cuestión es la *Escherichia coli*. Como consecuencia de esta gran problemática, los tratamientos tanto en personas como en animales, muchas veces no tienen efecto e incluso puede llegar a provocar la muerte (Agnew *et al.,* 2021). La OMS ha tomado la dirección de diversos planes de control para la RAM, dentro de ellos se encuentra la aplicación de enfoques como Una Salud y la creación del Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia y el Uso de Antimicrobianos (GLASS, por sus siglas en inglés), creado en el año 2015 para vigilar la RAM y el consumo de antimicrobianos (AMC) (Agnew *et al.,* 2021; McEwen y Collignon, 2018). Por ello, se evaluaron 186 cepas de *E. coli* obtenidos de cerdos para obtener un panorama de la frecuencia de los genes asociados a BLEE.

La evaluación de genes de BLEE suele ser complementario a la evaluación fenotípica. Sin embargo, existen reportes de diferencias de sensibilidad cuando se comparan las pruebas genéticas y otras pruebas fenotípicas como Concentración mínima inhibitoria (MIC) y la de difusión en disco (Yazdi *et al.,* 2012). Por ello, a continuación, se muestran los resultados de otros estudios en relación a la presencia de genes sobre el total de asilados para ser comparables con el objetivo de nuestro estudio. Así, los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que de los 186 aislados de *E. coli*, el 69.89% (130/186) presentaron al menos un gen BLEE otros estudios que obtuvieron una frecuencia de 40.2% (49/122) (Changkaew *et al.,* 2015), 36.6% (15/41) (Marrero-Moreno *et al.,* 2017), 31.48% (34/108) (Gundran *et al.,* 2019) y 2% (6//300) (Duan *et al.,* 2006), realizadas en Tailandia, Cuba, España y China, respectivamente. Esta frecuencia de *E coli* productoras de BLEE obtenida se acerca a la hallada por Changkaew *et al.* (2015), en aislados de *E. coli* procedentes de hisopados rectales de cerdos sanos de 3 granjas del centro de Tailandia.

De los 122 aislamientos, 54 (44.3%) fueron productores de BLEE fenotípicamente, de los cuales, 49/54 (90%) fueron confirmados mediante PCR como BLEE. Además, predominó el gen *bla* $_{CTX-M}$, seguido del gen *bla* $_{TEM}$ y casi todos los aislados tenían más de un gen a la vez, como en nuestro estudio. Los autores indican que las granjas privadas y tenían supervisión de la oficina nacional de ganadería, además producían su propio alimento. De igual manera, se menciona que, en Tailandia, los betalactámicos son unos de los antibióticos más utilizados en la industria porcina; las penicilinas son usadas como medicamentos alimentarios y las cefalosporinas de tercera generación, como tratamiento para enfermedades respiratorias. Productores de granjas porcinas en Lima, mencionan que los antibióticos más usados son macrólidos, betalactámicos, quinolonas, macrólidos, cefalosporinas y sulfonamidas (datos no documentados) además, en nuestro país no existen normas que regulen el uso de estos antibióticos en los animales de producción (Mejía, 2018). Esta frecuencia similar a la de nuestro estudio, podría deberse al uso regular de antibióticos que pertenecen a los mismos grupos de antimicrobianos. De igual modo, ambos países tienen una situación epidemiológica similar, ya que no existen muchos reportes de *E. coli* productoras de BLEE en porcinos (Yarin, 2023).

El segundo estudio mencionado, realizado por Marrero-Moreno *et al.* (2017), tuvo como objetivo detectar enterobacterias productoras de BLEE en granjas y mataderos, para lo cual, recolectaron muestras de hisopados de las manos de los operarios, superficies, instrumentos e hisopados rectales de animales sanos. Como resultado, obtuvieron que 41/200 muestras fueron positivas a bacterias gramnegativas, de las cuales 36/41 fueron confirmadas como *E. coli*. Se determinaron 15/41 (36.6%) aislados productores de BLEE mediante PCR, además, el gen predominante fue bla_{CTX-M}, seguido de bla_{TEM} y bla_{SHV} no se observó al igual que en nuestro estudio. Si bien los estudios tienen diferencias en la metodología sobre el origen de las muestras, es importante resaltar que el estudio mencionado sugiere que los genes pueden circular en animales y operarios de la producción porcina.

Asimismo, Gundran *et al.* (2019) en Filipinas, realizaron un estudio para determinar la prevalencia, antibiograma y perfil de resistencia a aislados de *E. coli* productores de BLEE aislados de cerdos sanos. Se tomaron 162 muestras (54 hisopados rectales de engorde, 54 de reproductores y 54 de botas). De los 108 hisopados de cerdos, 34 (31.5%) tuvieron al menos un gen *bla,* mientras que los hisopados de las botas tuvieron una frecuencia de 26% (14/54). Los autores mencionan que la ampicilina es uno de los antibióticos más usados, los cuales se encuentran dentro del grupo de los betalactámicos. La ligera diferencia entre nuestra frecuencia y la de los estudios mencionados podría también deberse a que algunos países sí toman medidas para combatir la RAM. Por ejemplo, en la Unión Europea y Estados Unidos, los antibióticos como las penicilinas y cefalosporinas de tercera, cuarta y quinta generación están prohibidas en la

producción porcina como antibióticos promotores de crecimiento (APC), mientras que, en nuestro país, no hay ninguna restricción respecto al uso de APC (Mejía, 2018). No obstante, en Perú, existe una guía para la implementación de Buenas Prácticas Pecuarias en producción de porcinos, la cual indica pautas como el almacenamiento, vía de administración y tiempo de retiro de los antibióticos usados en la producción porcina (SENASA, 2020). Además, se implementó el Plan multisectorial para enfrentar la resistencia a los antimicrobianos en el periodo 2019-2021, el cual tuvo como uno de sus objetivos, utilizar de forma óptima los medicamentos antimicrobianos en la salud humana y animal (Minsa, 2019). Sumado a esto, existe un proyecto de colaboración tripartito entre la FAO, OIE y la OMS titulado ¨Trabajando juntos para combatir la Resistencia a los antimicrobianos¨, el cual buscaba implementar planes de acción para abordar la RAM en países sudamericanos, incluyendo Perú durante el periodo 2020-2023 (FAO, 2024).

El presente estudio utilizó muestras del año 2019, por lo tanto, la frecuencia hallada podría ser elevada debido a que recién se estaba implementando el plan mencionado. Por otro lado, Duan *et al.* (2006) realizaron un estudio en Hong Kong (China) con el objetivo de identificar *E. coli* productoras de BLEE aisladas de 734 muestras fecales de animales sanos (cerdos, ganado y palomas). De las cuales se obtuvieron las siguientes frecuencias: 6/300 (2%) cerdos, 3/96 (3.1%) ganado y 1/33 (3%) palomas. En el caso de los cerdos, de los 6 aislados de *E. coli* positivos a BLEE, todas presentaron el gen $bla_{CTX\text{-}M}$ (6/6) y 5/6 presentaron el gen bla_{TEM}. A pesar de que es ese año aún no existían medidas de control para la RAM, se puede observar la baja frecuencia de aislados de *E. coli* productores de BLEE que había y no solo en cerdos La gran diferencia entre la frecuencia de este estudio (2%) y los resultados presentados (67%), podría estar relacionado a que los métodos de evaluación no eran muy precisos ni se conocían en detalle los genes presentes actualmente, mientras que, relativas altas frecuencias solo se reportaban en *Klebsiella pneumoniae* (Medeiros, 1997; Paterson, 2000). Por otro lado, un estudio publicado el año pasado en nuestro país (Luna *et al.,* 2023), detecta la presencia de los genes $bla_{CTX\text{-}M}$ (1/17) y bla_{TEM} (15/17) en aislados procedentes de muestras fecales de cerdos sanos obtenidas en el 2020. Esos resultados fueron obtenidos de secuenciamientos genéticos realizados a 17 aislados y destaca la presencia de $bla_{TEM\ 1b}$ y la importancia de $bla_{CTX\text{-}M,}$ ya que se comprobó su producción de BLEE fenotípicamente. Al igual que nuestro estudio, no se reportó la presencia del gen $bla_{SHV.}$ Los resultados tienen cierta similitud probablemente debido a que ambos se realizaron en Lima y se obtuvieron las muestras de cerdos sanos, además las muestras solo tuvieron un año de diferencia con respecto a la recolección.

En relación a los genes reportados en el presente estudio, el gen bla_{TEM} el que obtuvo la mayor frecuencia 66.7% (124/186), cabe destacar que casi el total de muestras positivas a al menos uno de los genes, fueron positivas a bla_{TEM} (124/130). Esta frecuencia elevada coincide

con algunos estudios, como en granjas de Tailandia, en donde el 100% (n=19) de los aislados lo presentaron (Boripun *et al.,* 2023). En ese estudio recolectaron muestras de heces y aguas residuales de granjas porcinas para caracterizar cepas de *E. coli* multirresistentes. Se obtuvieron 73 aislados de las heces identificados como *E. coli*, de los cuales se tomaron 19 muestras representativas para identificar genes de resistencia, en donde todos (19/19) presentaron el gen bla_{TEM} y ninguno el gen bla_{SHV}.

Otro estudio en Vietnam, identificó el fenotipo y genotipo de resistencia antimicrobiana de muestras fecales procedentes de cerdos. Se tuvieron en total 90 muestras (30 de cerdos destetados, 30 de cerdos en crecimiento y 30 en cerdos de engorde), se obtuvo una frecuencia de bla_{TEM} 97.8% (88/90) y la etapa con mayor frecuencia fue la de cerdos en crecimiento (30/30). Además, los autores encontraron una ligera correlación con la resistencia fenotípica a la ampicilina y a la amoxicilina (Duy *et al.,* 2021). Esto podría deberse a que el gen bla_{TEM} viene reportándose con mayor frecuencia en diversos países (Cruz y Hedreyda, 2017).

Estudios realizados en Latinoamérica (Brasil y Ecuador) han demostrado que el gen bla_{TEM} es más prevalente en animales como pavos, pollos y humanos (Hoepers *et al.,* 2018; Crecencio *et al.,* 2020; Ortega-Paredes; 2020) Esto puede suceder en parte a su facilidad de transmitirse vía horizontal a través de plásmidos (Castanheira *et al.,* 2021). Además, se ha demostrado que la presencia de *E. coli* productora de BLEE varía según su ubicación geográfica, además de otros factores ambientales, socioeconómicos, entre otros (Liu *et al.,* 2018). Como se ha señalado, en algunos países, el gen bla_{TEM} es uno de los genes más comunes que codifican BLEE, por lo tanto, la identificación del gen bla_{TEM} en este estudio podría ser una importante amenaza para la salud pública y granjas porcinas de Lima.

Actualmente, en contraste con nuestros resultados, el gen $bla_{CTX\text{-}M}$ es el que se reporta con mayor frecuencia de las BLEE como el estudio en España de Blanc *et al*. (2006), quienes buscaron identificar cepas de *E. coli* productoras de BLEE obtenidas de muestras de heces obtenidas granjas de pollos, cerdos y conejos. En el caso de los cerdos se tomaron 39 muestras identficadas como BLEE fenotípicamente, de los cuales 27/39 (69.2%) presentaron el gen $bla_{CTX\text{-}M}$, 12/39 (30.8%) presentaron el gen bla_{SHV} y no se detectó el gen bla_{TEM}. De igual manera, en el estudio de Marrero-Moreno *et al.* (2017) en Cuba (descrito previamente), el gen que más predominó fue $bla_{CTX\text{-}M}$ 15/17 (88.2%), seguido de bla_{TEM} 5/17 (29.4%). A pesar de que nuestra frecuencia de $bla_{CTX\text{-}M}$ (13.44%) no es la mayor en el presente estudio, cabe destacar la importancia de haber tenido muestras positivas a este gen, ya que sus reservorios principales son, además de los animales de producción, los hospitales y animales de compañía (Rossolini *et al.,* 2018; Mughini-Gras *et al.,* 2019). Asimismo, en Perú, se ha demostrado que $bla_{CTX\text{-}M}$ confiere resistencia a antibióticos como

la ceftriaxona (Luna *et al.,* 2023), el cual se usa frecuentemente en hospitales humanos de nuestro país (Cuadros *et al.,* 2020; Resurrección-Delgado *et al.,* 2020).

El gen bla_{SHV} no fue detectado en el presente estudio, así como el trabajo descrito por Changkaew *et al.* (2015), y el de Marrero-Moreno *et al.* (2017). Dichos estudios tienen en común que las muestras fueron recolectadas por hisopados rectales de cerdos aparentemente sanos. Sin embargo, el estudio de Blanc *et al.* (2006) halló una frecuencia de 12/39 (30.8%). Diversos autores señalan que el gen bla_{SHV} es el más común hallado en aislados de *K. pneumoniae*, a comparación de *E. coli*, lo que podría explicar nuestros resultados (Bastidas-Caldes *et al.,* 2023)

El presente estudio es uno de los primeros que detecta genes *bla* en aislados obtenidos a partir de hisopados rectales de cerdos sin diarrea en Lima. En nuestro país se han realizado algunos estudios enfocados en la detección fenotípica y sensibilidad antimicrobiana de cepas de *E. coli* aisladas de muestras de heces, como el estudio realizado Toledo *et al.* (2015), en el cual evaluaron muestras de heces de cerdos sin diarrea procedentes de un centro de beneficio y se determinó una elevada resistencia antimicrobiana a la tetraciclina (100%), seguido por la cefalotina, un antibiótico perteneciente a la familia BLEE, (97.2%). Por otro lado, un estudio más reciente realizado por Yarin (2023), cuyo objetivo fue la identificación fenotípica de *E. coli* productora de BLEE aislada de heces de cerdo de un matadero de Lima, obtuvo solo una frecuencia de 9.16% (11/120) resistente por lo menos aun betalactámico. La autora de este último estudio atribuye la baja frecuencia al plan estratégico para hacer frente a la resistencia a antibióticos que se llevó a cabo desde el 2019 al 2021. Asimismo, el estudio realizado por Luna *et al.* (2023) evidencia la presencia de genes BLEE en aislados de *E. coli* procedentes de heces de cerdos sanos. Los resultados del presente estudio, junto con los antecedentes mencionados, corresponde a una importante herramienta para la vigilancia epidemiológica de nuestro país, ya que se ha demostrado la alta frecuencia de aislados de *E. coli* productores de BLEE en cerdos sin diarrea y la importancia de continuar realizando estudios en esta especie, así como tener un mayor control o implementar medidas sanitarias.

La literatura menciona que las principales familias BLEE son TEM, SHV y CTX-M, sin embargo, también hacen referencia a que TEM-1, TEM-2 y SHV-1 no son BLEE, ya que no degradan eficazmente todos los betalactámicos, y a partir de ellos derivan los demás miembros de sus respectivas familias que son considerados como BLEE (Jacoby y Medreiros, 1991; Canton *et al.,* 2008). Cabe destacar que el presente estudio utiliza un cebador para identificar la familia TEM, así como otros autores que lo utilizan para identificar BLEE (Changnew *et al.,* 2015; Gundrán *et al.,* 2019). Además, al ingresar la secuencia utilizada al sistema BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), se encontró similitud con TEM-116, TEM-135, TEM-52, TEM-135,

TEM-248, TEM-12 y TEM-1. Así, estos cebadores tienen afinidad alta para detectar diferentes variedades de la familia TEM. Asimismo, existen estudios que han detectado tanto TEM-1 como TEM-2 en aislados identificados como BLEE fenotípicamente (Koudokpon *et al.,* 2018; Guzmán *et al.,* 2013), esto relacionado a la hiperproducción de la enzima, provocado por pequeños plásmidos multicopia o a mutaciones en el promotor. Cuando existe esta elevada producción de la enzima, causa un patrón fenotípico de resistencia compatible con la presencia de una BLEE (Navarro *et al.,* 2010).

VI. CONCLUSIONES

- Teniendo un tamaño de muestra de 186 aislados de *Escherichia coli* en hisopados rectales de cerdos sin diarreas provenientes de granjas tecnificadas en Lima en el año 2019, se detectó la presencia de genes de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE), siendo más frecuente el gen bla_{TEM} (66.7%), seguido de $bla_{CTX\text{-}M}$ (13.44%).
- El gen bla_{SHV} no fue identificado en el presente estudio.

VII. RECOMENDACIONES

- Determinar mediante pruebas fenotípicas las expresiones de estos genes.
- Complementar con el secuenciamiento genético para describir a detalle las variedades genéticas específicas de $bla_{TEM,}$ y $bla_{CTX\text{-}M}$.
- Los genes BLEE identificados en este estudio son los más comunes, sin embargo, sería importante evaluar la presencia de otras familias BLEE como OXA, GES y PER.

VIII. LITERATURA CITADA

1. ***Aarestrup F, Lertworapreecha M, Evans A, Bangtrakulnonth T, Chalermchaikit R, Hendriksen S, Wegener H. 2003.*** Antimicrobial susceptibility and occurrence of resistance genes among Salmonella enterica serovar Weltevreden from different countries. J. Antimicrob. Chemother 52(1): 715- 718.

2. ***Abushaheen A, Muzaheed A, Alosaim M, Mansy W, George M, Jhugroo P. 2020.*** Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. Dis Mon; 66(6):100971. Doi: 10.1016/j.disamonth.2020.100971

3. ***Álvarez D. 2010.*** Identificación de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias. Revista Habanera de Ciencias Médicas, 9(4): 516-524.

4. ***Amaral L, Martins A, Spengler G, Molnar J. 2014***. Efflux pumps of Gram-negative bacteria: what they do, how they do it, with what and how to deal with them. Front Pharmacol. 4:168–179

5. ***Ambler R. 1980***. La estructura de las β-lactamasas. Filos. Trans. R. Soc. Londres. B 289: 321-331.

6. ***Agnew E, Dolecek C, Hasan R, Lahra M, Merk H, Perovic O, Sievert D, Smith R, Taylor A, Turner P. 2021***. Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report. Geneva: World Health Organization. 82 p.

7. ***Ali J, Rafiq QA, Ratcliffe E. 2018***. Antimicrobial resistance mechanisms and potential synthetic treatments. Future Science OA, 4(4), FSO290. doi:10.4155/fsoa-2017-0109

8. ***Arce Z, Llontop J, Alarcón E, López E. 2014***. Detección de los genes SHV, TEM y CTX-M en cepas de *Escherichia coli* β-lactamasas de espectro extendido procedentes de un Hospital de Chiclayo- Perú.

9. Asif M. 2017. Antimicrobial Agents. J Anal Pharm Res 4(3): 00104. doi: 10.15406/japlr.2017.04.00104

10. ***Ball PR, Shales SW, Chopra I. 1980*** Plasmid-mediated tetracycline resistance in *Escherichia Coli* involves increased efux of the antibiotic. Biochem Biophys Res Commun 93(1):74–81. https://doi.org/10.1016/S0006-291X(80)80247-6

11. ***Barros MM, Castro J, Araújo D, Campos AM, Oliveira R, Silva S, Outor-Monteiro D, Almeida C. 2022.*** Swine Colibacillosis: Global Epidemiologic and Antimicrobial Scenario. Antibiotics;12(4):682. https://doi.org/10.3390/antibiotics12040682

12. ***Bastidas-Caldes C, Cisneros-Vásquez E, Zambrano A, Mosquera-Maza A, Calero-Cáceres W, Rey J, Yamamoto Y, Yamamoto M, Calvopiña M, de Waard JH. 2023***. Co-Harboring of Beta-Lactamases and mcr-1 Genes in *Escherichia coli* and Klebsiella pneumoniae from Healthy Carriers and Backyard Animals in Rural Communities in Ecuador. Antibiotics. 12(5):856. https://doi.org/10.3390/antibiotics12050856

13. ***Bauernfeind A, Schweighart S, Grimm H. 1990.*** A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli.* Infection, 18(5), 294–298. doi:10.1007/bf01647010

14. ***Belaaouaj A. 1994.*** Nucleotide sequences of the genes coding for the TEM-like beta-lactamases IRT-1 and IRT-2 (formerly called TRI-1 and TRI-2). FEMS Microbiol Lett. 120(1-2): 75–80.

15. ***Bergšpica I, Kaprou G, Alexa E, Prieto M, Alvarez-Ordóñez A. 2020.*** Extended Spectrum β-Lactamase (ESBL) Producing *Escherichia coli* in Pigs and Pork Meat in the European Union. Antibiotics, 9(10), 678. doi:10.3390/antibiotics9100678

16. ***Blanc V, Mesa R, Saco M, Lavilla S, Prats G, Miró E, Llagostera M. 2006.*** ESBL- and plasmidic class C β-lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. Vet Microbiology 118(3-4): 299–304. doi:10.1016/j.vetmic.2006.08.002

17. ***Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. 2014***. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nature Reviews Microbiology, 13(1), 42–51. doi:10.1038/nrmicro3380

18. ***Borges CA, Beraldo LG, Maluta RP. 2012.*** Shiga *Escherichia coli* toxigénica y atípica enteropatógena en heces y canales de cerdos sacrificados. Pathog Dis transmitida por los alimentos. 10(1) : 1–7.

19. ***Boripun R, Saengsawang P, Intongead S, Narinthorn R, Wongtawan T, Nissapatorn V, Pereira M, Mitsuwan W. 2023***. Molecular characterization and nucleotide substitution of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from environmental swine farms, Emerging Contaminants; 9(4). //doi.org/10.1016/j.emcon.2023.100249.

20. ***Bozcal E. 2019***. Insight into the mobilome of *Escherichia coli*. En: The universe of Escherichia coli. Starčič M. ed. 148 p. 10.5772/intechopen.73717

21. ***Bray J. 1945.*** Isolation of antigenically homogeneous strains of Bact. coli neapolitanum from summer diarrhœa of infants. J Pathol Bacteriol. 57 (2): 239–247.

22. ***Bush K, Jacoby G, Medeiros A. 1995***. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother; 39(6): 1211-1233.

23. ***Bush K. 2004.*** Antibacterial drug discovery in the 21st century. Clinical Microbiology and Infection, 10, 10–17. doi:10.1111/j.1465-0691.2004.1005.x

24. ***Camacho L, Perozo A, Castellano M, Bermúdez E, Harris B. 2004***. Métodos fenotípicos para la detección de betalactamasas de espectro extendido en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 24(1-2): 98-103.

25. ***Canton R, Morosini MI, de la Maza OMS. 2008.*** IRT and CMT β-lactamases and inhibitor resistance. Clin Microbiol Infect 2008; 14 (1): 53–62.

26. Castanheira M, Simner P, Bradford P. 2021. Extended-spectrum β-lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection, JAC-Antimicrob Resist. 3(3): 1-21. Doi: 10.1093/jacamr/dlab092

27. Castro J, Barros M, Araujo D, Campos A, Oliveira R, Silva S y Almeida C. 2022. Swine enteric colibacillosis: Current treatment avenues and future directions. Front Vet Sci. doi: 10.3389/fvets.2022.981207.

28. ***Changkaew K, Intarapuk A, Utrarachkij F, Nakajima C, Suthienkul O, Suzuki Y. 2015.*** Antimicrobial Resistance, Extended-Spectrum β-Lactamase Productivity, and Class 1 Integrons in *Escherichia coli* from Healthy Swine. Journal of Food Protection; 78(8): 1442-1450 p. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-445.

29. ***Cox G, Wright GD. 2013.*** Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. Int J Med Microbiol. 303(6-7):287–292

30. ***Colom K, Pérez J, Alonso R, Fernández-Aranguiz A, Lariño E, Cisterna R. 2003.*** Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of blaTEM, bla(SHV) and blaOXA-1 genes in Enterobacteriaceae. FEMS Microbiol Lett;223(2):147-51. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00306-9.

31. ***Crecencio R, Brisola M, Bitner D, Frigo A, Rampazzo L, Borges K, Furian T, Salle C, Moraes H, Faria G. 2020.*** Antimicrobial Susceptibility, Biofilm Formation and Genetic Profiles of *Escherichia coli* Isolated from Retail Chicken Meat. Infect. Genet. Evol. 84(1), 104355 p.

32. ***Crofts T, Gasparrini A, Dantas G. 2017***. Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. Nature Reviews Microbiology, 15(7), 422–434. doi:10.1038/nrmicro.2017.28

33. ***Cruz M, Hedreyda C. 2017***. Detection of plasmid-borne β-lactamase genes in extended-spectrum β-lactamase (ESBL) and non-ESBL-producing *Escherichia coli* clinical isolates. Philipp J Sci.146(1):167–75 p.

34. ***Davies J, Davies D. 2010.*** Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. Microb and Molec Biology Reviews 74(3): 417-433. doi:10.1128/mmbr.00016-10

35. ***Deccache Y, Irenge LM, Ambroise J, Savov E, Marinescu D, Chirimwami RB, Gala JL. 2015.*** A qPCR and multiplex pyrosequencing assay combined with automated data processing for rapid and unambiguous detection of ESBL-producers Enterobacteriaceae. AMB Express;5(1):136. doi: 10.1186/s13568-015-0136-1.

36. ***Di Martino P. 2022***. Antimicrobial agents and microbial ecology. AIMS Microbiol;8(1):1-4. doi: 10.3934/microbiol.2022001.

37. ***Domingues S, Harms K, Fricke WF, Johnsen PJ, da Silva GJ, Nielsen KM. 2012.*** Natural Transformation Facilitates Transfer of Transposons, Integrons and Gene Cassettes between Bacterial Species. PLoS Pathogens; 8(8): e1002837. doi:10.1371/journal.ppat.1002837

38. ***Dorado-García A, Smid JH, van Pelt W, Bonten MJM, Fluit AC, van den Bunt G, Heederik DJJ 2018.*** Molecular relatedness of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from humans, animals, food and the environment: a pooled analysis. J Antimicrob Chemother; 73(2), 339–347. doi:10.1093/jac/dkx397

39. ***Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. 2008.*** Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. Clin Microbiol Infect. 14(1):90-103. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01846.x

40. ***Duan R, Sit T, Wong S, Wong R, Chow K, Mak G, Ho P. 2006.*** *Escherichia coli* Producing CTX-M β-Lactamases in Food Animals in Hong Kong. Microbial Drug Resistance 12(2): 145–148. doi:10.1089/mdr.2006.12.145

41. ***Duy DT, Anh NLL, Thoa NTK, K P, S T, JJ CM, Hien LT, Nam NTT, Toan, NT. 2021.*** Identification of genotype and phenotype of antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from pigs in southern Vietnam. Thai J Vet Med; 51(1), 125-132.

42. ***Ewers C, Bethe A, Semmler T, Guenther S, Wieler LH. 2012.*** Extended-spectrum b-lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. Clin Microbiol Infect 18: 646–655.

43. ***Fairbrother JM, Nadeau É. 2019***. Colibacilosis. En: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramírez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, Zhang J, eds. Enfermedades de los cerdos ;Nueva Jersey: Hoboken.807–834 .

44. ***Fang H, Ataker F, Hedin G, Dornbusch K. 2008.*** Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases among *Escherichia coli* isolates collected in a Swedish hospital and its associated health care facilities from 2001 to 2006. J Clin Microbiol ;46(2):707-12. doi: 10.1128/JCM.01943-07

45. ***FAO, 2024***. Proyecto de Colaboración Tripartito (FAO, OIE, OPS/OMS) "Trabajando juntos para combatir la Resistencia a los Antimicrobianos". [Internet], [11 enero 2024]. Disponible en: https://www.fao.org/antimicrobial-resistance/projects/ongoing/project-7/es/

46. ***Farfán-García AE, Ariza-Rojas SC, Vargas-Cárdenas FA, Vargas-Remolina LV. 2016.*** Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. Rev Chil infectología. 33(4):438–450. doi:10.4067/s0716-10182016000400009.

47. ***García-Sánchez, Garza L,Casanovas C, Cárceles S, Oliver S, Espigares D. 2020.*** ¿Cómo podemos reducir el impacto de la enfermedad de los edemas en nuestra granja? Anaporc; 16(1): 36-37 p.

48. ***Gioia-Di Chiacchio RM, Cunha MPV, Sturn RM. 2016.*** Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): Zoonotic risks associated with psittacine pet birds in home environments. Vet Microbiol. 184(1): 27-30. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.01.004

49. ***Gomes TAT, Elias WP, Scaletsky ICA, Guth BEC, Rodrigues JF, Piazza RMF, Ferreira LCS, Martinez MB. 2016***. Diarrheagenic *Escherichia coli.* Brazilian J Microbiol. 47:3–30. doi:10.1016/j.bjm.2016.10.015.

50. ***González AG, Cerqueira AM, Guth BEC. 2016.*** Serotypes, virulence markers and cell invasion ability of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy dairy cattle. J Appl Microbiol. 121(4) : 1130-1143. doi: 10.1111/jam.13230

51. ***Gundran R, Cardenio P, SalvadorR, Siso F, Benigno C, Kreausukon K, Pichpol, Punyapornwithaya. 2019***. Prevalence, Antibiogram, and Resistance Profile of Extended-Spectrum B-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates from Pig Farms in Luzon, Philippines. Microbial Drug Resistance. 1-8 .

52. ***Guzmán M, Rodríguez E, Antón K, Silva S, Navarro J, Lastra L, Salazar E, Alonso G. 2013.*** Genes bla_{TEM} ,bla_{SHV} *y* bla_{CTX-M} en enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria. Invest Clin; 54(3): 235-245.

53. ***Hasman H, Mevius D, Veldman K, Olesen I, Aarestrup F. 2005.*** β-Lactamases among extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands, Journal of Antimicrob Chemotherapy 56(1): 115–121.

54. ***Hebbelstrup Jensen B, Olsen KE, Struve C, Krogfelt KA, Petersen AM. 2014.*** Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 2014; 27(1): 614–630. doi: 10.1128/CMR.00112-13.

55. ***Hernandes RT, Elias WP, Vieira AM, Gomes TAT. 2009.*** An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett. 297: 137-149. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01664.x

56. ***Hoepers P, Silva P, Rossi D, Valadares E, Ferreira B, Zuffo J, Koerich P, Fonseca B. 2018.*** The Association between Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) and Ampicillin C (AmpC) Beta-Lactamase Genes with Multidrug Resistance in *Escherichia coli* Isolates Recovered from Turkeys in Brazil. Br. Poult. Sci, 59(1):396–401 p.

57. ***Koudokpon H, Dougnon V, Hadjadj L, Kissira I, Fanou B. 2018.*** First Sequence Analysis of Genes Mediating Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) bla-TEM, SHV- and CTX-M Production in Isolates of Enterobacteriaceae in Southern Benin. Int J Infect; 5(4):e83194. https://doi.org/10.5812/iji.83194.

58. ***Jacoby G, Medeiros A. 1991***. More extended-spectrum beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother; 35(1): 1697-1704. 10.1128/AAC.35.9.1697.

59. ***Jesser KJ, Levy K. 2020***. Updates on defining and detecting diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. Curr Opin Infect Dis. 33(5):372–380. doi:10.1097/QCO.0000000000000665.

60. ***Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. 2004.*** Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2(2):123–140. doi: 10.1038/nrmicro818

61. ***Levine MM. 1987.*** *Escherichia coli* That Cause Diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent. J Infect Dis. 155(1) : 377–389

62. ***Lerminiaux N, Cameron A. 2018***. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. Canadian Journal of Microbiology. doi:10.1139/cjm-2018-0275

63. ***Liakopoulos A, Mevius D, Ceccarelli D. 2016.*** A Review of SHV Extended-Spectrum β-Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. Front Microbiol; 5(7):1374. doi: 10.3389/fmicb.2016.01374.

64. ***Liu X, Liu H, Wang L, Peng Q, Li Y, Zhou H, Li Q. 2018.*** Molecular Characterization of Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing Multidrug Resistant *Escherichia coli* From Swine in Northwest China. Frontiers in Microbiology, 9. doi:10.3389/fmicb.2018.01756

65. ***Luna L, Carhuaricra D, Rodríguez C, Durán C, Ignación Y, Silvestre T, Marcelo G, Rosadio R, Maturrano L. 2023***. Genomic analysis of multidrug-resistant *Escherichia coli* strains carrying the *mcr-1* gene recovered from pigs in Lima-Peru. Comp Immunol Microbiol Infect Dis; 99:1-13 p. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2023.102019

66. ***Luppi A. 2017.*** Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance Porc Health Manag; 3(1). doi:10.1186/s40813-017-0063-4

67. ***Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. 2012.*** Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin. Microbiol. Infect. 18 (3), 268–281. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011. 03570.x.

68. ***Mandakini R, Roychoudhury P, Subudhi PK, Kylla H, Samanta I, Bandyopadhayay S, Dutta TK. 2020***. Higher prevalence of multidrug-resistant extended-spectrum β-lactamases producing *Escherichia coli* in unorganized pig farms compared to organized pig farms in Mizoram, India. Vet World;13(12):2752-2758. doi: 10.14202/vetworld.2020.2752-2758.

69. ***Marks SL, Rankin SC, Byrne BA, Weese JS. 2011***. Enteropathogenic Bacteria in Dogs and Cats: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Control. Journal of Veterinary Internal Medicine, 25(6): 1195–1208. doi:10.1111/j.1939-1676.2011.00821.x

70. ***Marrero-Moreno C, Mora- Llanes M, Hernández-Fillor R, Báez-Arias M, García-Morey T, Espinosa-Castaño I. 2017.*** Identificación de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs) en instalaciones porcinas de la provincia de Matanzas. Rev Salud Anim 39(3): 1–15.

71. ***Martins FH, Guth BEC, Piazza RM. 2015.*** Diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep flocks of Paraná State, southern Brazil. Vet Microbiol. 175(1): 150-156. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.11.003

72. ***Martinez J, Baquero F. 2000.*** Mutation frequencies and antibiotic resistance. Antimicrob Agents Chemother. 44(7):1771–1777

73. ***McEwen SA, Collignon PJ. 2018.*** Antimicrobial Resistance: A One Health Colloquium. Microbiol Spectr. 6(2):1–26. doi:10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017.

74. ***Medeiros A. 1997***. Evolution and dissemination of betalactamases accelerated by generations of betalactam antibiotics. Clinical Infectious diseases; 24(1): 19-45p.

75. ***Melton-Celsa AR. 2014.*** Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. Microbiol Spectr. 2(4). doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013.

76. ***Mejía EM. 2018.*** Antibióticos prohibidos en Estados Unidos (EE. UU) y la Unión europea (UE), autorizados para el uso veterinario en producción avícola, bovina y porcina en el Perú. Tesis para médico veterinario. Perú: Universidad Peruana Cayetano Heredia. 38p.

77. ***[MINAGRI] Ministerio de agricultura y riego. 2020.*** Panorama y perspectivas de la producción de carne de cerdo en el Perú. 24 p.

78. ***[MINSA] Ministerio de salud. 2019***. Plan multisectorial para enfrentar la resistencia antimicrobiana. 132p

79. ***Moredo FA, Cappuccio JA, Insarralde L, Perfumo CJ, Quiroga MA, Leotta GA. 2012.*** Caracterización genotípica de aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos de cerdos con diarrea posdestete y enfermedad de los edemas. Rev Argent Microbiol 44: 85-88.

80. ***Moreno C, González R, Beltrán C. 2009***. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello, 69 (2), 185-192

81. ***Morrison L, Zembower TR. 2020***. Antimicrobial Resistance. Gastrointest Endosc Clin N Am. 30(4):619–635. doi:10.1016/j.giec.2020.06.004.

82. ***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 Publica. 28(4):648–656. doi:10.17843/rpmesp.2011.284.430.

83. ***Mughini-Gras L, Dorado-García A, van Duijkeren E, van den Bunt G, Dierikx CM, Bonten MJM, Bootsma MCJ, Schmitt H, Hald T, Evers EG, de Koeijer A, van Pelt W, Franz E, Mevius DJ, Heederik DJ. 2019***. Attributable sources of community-acquired carriage of *Escherichia coli* containing β-lactam antibiotic resistance genes: a population-based modelling study. Lancet Planetary Health 3(1): e357–e369. doi: 10.1016/S2542-5196(19)30130-5.

84. ***Naas T, Cuzon G, Truong H, Bernabeu S, Nordmann P. 2010***. Evaluation of a DNA microarray, the check-points ESBL/KPC array, for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum beta-lactamases and KPC carbapenemases; 54(8):3086–3092. doi:10.1128/aac.01298-09

85. ***Nadeem SF, Gohar UF, Tahir SF, Mukhtar H, Pornpukdeewattana S, Nukthamna P, Massa S. 2020.*** Antimicrobial resistance: more than 70 years of war between humans and

bacteria. Critical Reviews in Microbiology, 46(5), 578–599. doi:10.1080/1040841x.2020.181368

86. ***Nagy B, Fekete PZ. 2005.*** Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. Int J Med Microbiol. 295(6–7):443–454. doi:10.1016/j.ijmm.2005.07.003.

87. ***Nataro JP, Kaper JB. 1998.*** Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 11 (1): 142-201

88. Navarro F, Miró E. 2007. Entorno genético de las BLEE: implicaciones en la transmisión. Enferm Infecc Microbiol Clin.25(2):11-17

89. Navarro F, Miró E, Mirelis B. 2010. Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica; 28(9):638-645**.**

90. Navarro-García F, Elias WP. 2011. Autotransportadores y virulencia de E. coli enteroagregativa . Microbios intestinales. 2(1): 13-24

91. ***Nüesch-Inderbinen MT, Hächler H, Kayser FH. 1996.*** Detection of genes coding for extended-spectrum SHV beta-lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the E test. Eur J Clin Microbiol Infect Dis;15(5):398-402. doi: 10.1007/BF01690097.

92. ***O'Neill, J. 2014***. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. The Review on Antimicrobial Resistance. 20 p.

93. ***[OPS]Organización Panamericana de la Salud. 2019.*** Tratamiento de las enfermedades infecciosas 2020-2022. Octava edición. Washington, D.C.: OPS.

94. ***Ortega-Paredes D, de Janon S, Villavicencio F, Ruales K, De La Torre K, Villacís J, Wagenaar J, Matheu J, Bravo-Vallejo C, Fernández-Moreira E. 2020.*** Broiler Farms and Carcasses Are an Important Reservoir of Multi-Drug Resistant *Escherichia coli* in Ecuador. Front. Vet. Sci. 7(1), 1–8.

95. ***Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. 2018***. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. Clin Microbiol Rev.;31(4). doi: 10.1128/CMR.00088-17.

96. ***Paterson D. 2000.*** Recommendation for treatment of severe infections caused by Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs). Microbiología clínica e infección; 6(9):460–463. doi:10.1046/j.1469-0691.2000.00107.x

97. ***Perozo A, Castellano M. 2009***. Detección de Betalactamasas de Espectro Extendido en cepas de la familia Enterobacteriaceae. Kasmera, 37(1): 25-37.

98. ***Poolman J, Geurtsen J, Weerdenburg E. 2023***. *Escherichia coli*. Reference module in biomedical sciences. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99967-0.00050-8

99. ***Prescott JF, Brad Hanna WJ, Reid-Smith R, Drost K. 2002***. Antimicrobial drug use and resistance in dogs. Can Vet J 43(2): 107–116. doi:10.1111/j.1751-0813.2002.tb11003.x.

100. ***Puño-Sarmiento J, Medeiros L, Chiconi C, Martins F, Pelayo J, Rocha S, Blanco J, Blanco M, Zanutto M, Kobayashi R, et al. 2013.*** Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats in Brazil. Vet Microbiol. 166(3–4):676–680. doi:10.1016/j.vetmic.2013.07.007.

101. ***Rahman T, Yarnall B, Doyle DA. 2017.*** Efflux drug transporters at the forefront of antimicrobial resistance. Eur Biophys J. 46(7):647–653

102. ***Ramos S, Silva V, Dapkevicius MdLE, Caniça M, Tejedor-Junco MT, Igrejas G, Poeta P. 2020.*** *Escherichia coli* as Commensal and Pathogenic Bacteria among Food-Producing Animals: Health Implications of Extended Spectrum β-Lactamase (ESBL) Production. Animals; 10(12):2239. https://doi.org/10.3390/ani10122239

103. ***Rawat D, Nair D. 2010.*** Extended-spectrum β-lactamases in Gram Negative Bacteria. J Glob Infect Dis.;2(3): 263. doi:10.4103/0974-777x.68531

104. ***Resurrección-Delgado C, Chiappe-Gonzalez A, Bolarte-Espinoza J, Martínez-Dionisio L, Muñante-Meneses R, Vicente-Lozano Y, Rondan-Guerrero P, Chávarry-Velásquez W, Álvarezcano-Berroa J, Montenegro-Idrogo J. 2020***. Uso de antibióticos en pacientes internados en un hospital nacional de Lima, Perú. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica; 37(4): 620-626. https://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2020.374.5073

105. ***Ribeiro LF, Barbosa MMC, Pinto FR. 2015.*** Shiga toxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* in water and fish from pay-to-fish ponds. Lett Appl Microbiol. 62(1): 216–220. doi: 10.1111/lam.12536.

106. ***Richmond M y Sykes R. 1973.*** The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. Adv. Microbio. Physiol. 9: 31-88. doi: 10.1016/s0065-2911(08)60376-8.

107. ***Rivera A, Larrosa N, Mirelis B, Navarro F. 2014.*** Importancia de los controles de calidad para la detección de la resistencia a antibióticos β-lactámicos en enterobacterias. Enferm Infecc Microbiol Clin. 32(1): 30-36. Doi: 10.1016/S0213-005X(14)70147-8

108. ***Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. 2008***. The spread of CTX-M-type extended-spectrum β-lactamases. Clin Microbiol Infect 14(1): 33–41. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01867.x

109. ***Ruiz-Roldán L, Martínez-Puchol S, Gomes C. 2018***. Presence of multidrug resistant enterobacteriaceae and *Escherichia Coli* in meat purchased in traditional markets of Lima. Rev Perú Med Exp Salud Publica 35 (3): 425-432.

110. ***Saldarriaga F, Calle S, Camacho C. 2000***. Resistencia antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* provenientes de lechones lactantes criados en una granja tecnificada de Lima. Rev Inv Vet Perú 11(2): 93-98.

111. ***Samanta I, Bandyopadhyay S. 2020***. *Escherichia coli*. In Antimicrobial Resistance in Agriculture 171-193. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815770-1.00015-8

112. ***Sánchez LC, Corrales LC***. 2005. Congelación Bacteriana. Factores que intervienen en el proceso. Vol. 3(3): 109-113.

113. ***Schmithausen RM, Schulze-Geisthoevel SV, Heinemann C, Bierbaum G, Exner M, Petersen B, Steinhoff-Wagner J. 2018..*** Reservoirs and Transmission Pathways of Resistant Indicator Bacteria in the Biotope Pig Stable and along the Food Chain: A Review from a One Health Perspective. Sustainability; 10(11):3967. https://doi.org/10.3390/su10113967

114. ***[SENASA] Servicio Nacional de Sanidad Agraria. 2020.*** Guía para la implementación de Buenas Prácticas Pecuarias (BPP) en producción de porcinos. Lima: SENASA. 107. [Internet], [07 marzo 2024]. Disponible en: https://www.gob.pe/institucion/senasa/informes-publicaciones/997316-guia-de-buenas-practicas-pecuarias-en-produccion-de-porcinos

115. ***Stevens, MP y Frankel, GM 2014.*** The Locus of Enterocyte Effacement and Associated Virulence Factors of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Microbiol Spectr; 2 (4). doi:10.1128/microbiolspec.ehec-0007-2013

116. ***Strachan C, Davies J. 2017.*** The Whys and Wherefores of Antibiotic Resistance. Cold Spring Harb Perspect Med. 7(2):a025171. doi: 10.1101/cshperspect.a025171.

117. ***Silva RM, Toledo MRF, Trabulsi LR. 1980.*** Características bioquímicas y culturales de la *Escherichia coli* invasora . J Clin Microbiol. 1980; 11(1) : 441–444

118. ***Sullivan K, Diekema D. 2016.*** Overview of Molecular Diagnostics in Multiple-Drug-Resistant Organism Prevention: Focus on Multiple-Drug-Resistant Gram-Negative Bacterial Organisms. En: Pershing D, ed. Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice. 3º ed, Washington DC: ASM Press. 197-211 p.

119. ***Tabaran F y Tabaran A.*** 2019. Edema disease of swine: a review of the pathogenesis. Porcine research. 9(1): 7-14 p.

120. ***Toledo E, Falcon N, Flores C, Rebatta M, Guevara J, Ramos D. 2015.*** Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* obtenidas de muestras de heces de cerdos destinadas a consumo humano. Salud y Tecno Vet 3(2): 35-40.

121. ***Trabulsi LR, Toledo MRF, Murahovschi J, Fagundes Neto U, Candeias JAM. 1985.*** Epidemiología de la enfermedad diarreica en América del Sur. En: Tzipori S. Diarrea infecciosa en los jóvenes. Elsevier Biol. Medicina. Imprenta; Amsterdam: 121-125.

122. ***Trongjit S, Angkittitrakul S, Chuanchuen R. 2016.*** Occurrence and molecular characteristics of antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from broilers, pigs and meat products in Thailand and Cambodia provinces. Microbiol Immunol; 60(9):575-85. doi: 10.1111/1348-0421.12407. PMID: 27474453.

123. ***Uber AP, Trabulsi LR, Irino K. 2006.*** Enteroaggregative *Escherichia coli* from humans and animals differ in major phenotypical traits and virulence genes. FEMS Microbiol Lett. 256(1) : 251-257. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00124.x

124. ***Vidal J, Canizález-Román A, Gutiérrez-Jiménez J, Navarro-García F. 2007.*** Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. Salud Pública de México, 49(5), 376-386 p.

125. ***Waksman S. 1973***. History of the word 'antibiotic.' J. Hist. Med. Allied Sci 28: 284–286

126. ***Wiegand I, Geiss H, Mack D, Sturenburg E, Seifert H. 2007***. Detection of extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures. J Clin Microbiol, 45(4): 1167–1174. doi:10.1128/jcm.01988-06

127. ***[WHO] World Health Organization. 2021***. WHO integrated global surveillance on ESBL-producing E. coli using a "One Health" approach: implementation and opportunities. Geneva: World Health Organization. 76 p.

128. ***Yarin J. 2023.*** Identificación fenotípica de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas de heces de cerdos de un matadero de Lima. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 71 p.

129. ***Yazdi M, Nazemi A, Mirinargasi M, Jafarpour M, Sharifi SH.*** 2012. Genotypic versus Phenotypic methods to detect Extended-Spectrum BetaLactamases (ESBLs) in Uropathogenic *Escherichia coli.* Annals of Biological Research; 3(5): 2454-2458.

130. ***Zhang W. 2014***. Progress and Challenges in Vaccine development Against Enterotoxigenic *Escherichia Coli* (ETEC)-Associated porcine Post- Weaning Diarrhoea (PWD). J Vet Med Res. 1 (2):1006 p.

131. ***Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Stevenson GW, Schwartz KJ. 2012***. Diseases of swine. John Wiley & Sons.

IX. ANEXOS

Anexo1. Esquema de clasificación de betalactamasas (Adaptado de: Bush y Jacoby, 2010)

Bush-Jacoby (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros (1995)	Clase molecular (subclase)	Sustratos distintivos	Inhibido por		Definir características	Enzimas representativas
				AC o TZB	EDTA		
1	1	C	Cefalosporinas	No	No	Mayor hidrólisis de cefalosporinas que bencilpenicilina; hidroliza las cefamicinas	*E. coli* AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI	C	Cefalosporinas	No	No	Aumento de la hidrólisis de ceftazidima y, a menudo, de otros oxiimino-β-lactámicos	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penicilinas	Si	No	Mayor hidrólisis de la bencilpenicilina que de las cefalosporinas	PC1

2b	2b	A	Penicilinas, cefalosporinas tempranas.	Si	No	Hidrólisis similar de bencilpenicilina y cefalosporinas.	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Cefalosporinas de espectro extendido, monobactamas	Si	No	Aumento de la hidrólisis de oxiimino-β-lactámicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, POR-1, VEB-1
2	2	A	Penicilinas	No	No	Resistencia al ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Cefalosporinas de espectro extendido, monobactamas	No	No	Aumento de la hidrólisis de oxiimino-β-lactámicos combinado con resistencia al ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	carbenicilina	Si	No	Aumento de la hidrólisis de carbenicilina.	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicilina cefepima	Si	No	Aumento de la hidrólisis de carbenicilina, cefepima y cefpiroma.	RTG-4
2d	2d	D	cloxacilina	V	No	Aumento de la hidrólisis de cloxacilina u oxacilina.	OXA-1, OXA-10

2de	NI	D	Cefalosporinas de espectro extendido	V	No	Hidroliza cloxacilina u oxacilina y oxiimino-β-lactámicos.	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenémicos	V	No	Hidroliza cloxacilina u oxacilina y carbapenémicos	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Cefalosporinas de espectro extendido	Si	No	Hidroliza las cefalosporinas. Inhibido por ácido clavulánico pero no por aztreonam	CEPA
2f	2f	A	Carbapenémicos	V	No	Aumento de la hidrólisis de carbapenémicos, oxiimino-β-lactámicos y cefamicinas.	KPC-2, IMI-1, PYME-1
3a	3	B(B1)	Carbapenémicos	No	Si	Hidrólisis de amplio espectro que incluye carbapenémicos, pero no monobactámicos	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
		B(B3)					L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B(B2)	Carbapenémicos	No	Si	Hidrólisis preferencial de carbapenémicos.	CphA, Sfh-1

AC: ácido clavulánico, TZB: tazobactam, V: variable.

Anexo 2. Protocolo de purificación de ADN Genomic de bacterias Gram negativas.

1. Inocular las bacterias en tubos de microcentrífuga de 1.5 a 2 ml de capacidad, luego centrifugar durante 10 min a 5000 x g. Desechar el sobrenadante.
2. Resuspender el precipitado en 180 uL de buffer de lisis.
3. Incubar a 56 °C mientras se agita la muestra hasta que este lisada por completo.
4. Agregar 20 uL de solución Rnasa A, mezclar mientras se agita e incubar durante 10 min a temperatura ambiente.
5. Añadir 200 uL de solución de lisis y mezclar mientras se agita la muestra durante 15 segundos hasta que la mezcla esté homogénea.
6. Adicionar 400 uL de etanol al 50% y mezclar.
7. Transferir el preparado a la Columna de Purificación insertado en un tubo colector. Centrifugar durante 1 min a 6000 x g. Descartar el contenido y colocar la columna en un nuevo tubo colector de 2 mL.
8. Adicionar 500 uL del 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. Centrifugar por 3 min a velocidad máxima. Descartar el contenido del tubo colector y colocarlo en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
10. Añadir 200 uL del buffer de elución previamente calentado al medio de la columna de purificación para evitar al ADN, incubar por 2 min a temperatura ambiente y centrifugar por 1 minuto a 8000 x g.
11. Desechar la columna de purificación. Utilizar el ADN extraído inmediatamente de lo contrario, almacenar el ADN purificado a -20°C.

Anexo 3. Lista de cepas utilizadas en el presente estudio y lugares de procedencia

1	EC - 196	34	EC - 231	67	EC - 264	100	EC - 297	133	EC - 353	166	EC - 386
2	EC - 197	35	EC - 232	68	EC - 265	101	EC - 298	134	EC - 354	167	EC - 387
3	EC - 198	36	EC - 233	69	EC - 266	102	EC - 299	135	EC - 355	168	EC - 388
4	EC - 199	37	EC - 234	70	EC - 267	103	EC - 300	136	EC - 356	169	EC - 389
5	EC - 200	38	EC - 235	71	EC - 268	104	EC - 301	137	EC - 357	170	EC - 390
6	EC - 201	39	EC - 236	72	EC - 269	105	EC - 302	138	EC - 358	171	EC - 391
7	EC - 202	40	EC - 237	73	EC - 270	106	EC - 303	139	EC - 359	172	EC - 392
8	EC - 203	41	EC - 238	74	EC - 271	107	EC - 304	140	EC - 360	173	EC - 393
9	EC - 204	42	EC - 239	75	EC - 272	108	EC - 305	141	EC - 361	174	EC - 394
10	EC - 205	43	EC - 240	76	EC - 273	109	EC - 306	142	EC - 362	175	EC - 395
11	EC - 206	44	EC - 241	77	EC - 274	110	EC - 307	143	EC - 363	176	EC - 396
12	EC - 207	45	EC - 242	78	EC - 275	111	EC - 308	144	EC - 364	177	EC - 397
13	EC - 208	46	EC - 243	79	EC - 276	112	EC - 309	145	EC - 365	178	EC - 398
14	EC - 209	47	EC - 244	80	EC - 277	113	EC - 310	146	EC - 366	179	EC - 399
15	EC - 210	48	EC - 245	81	EC - 278	114	EC - 311	147	EC - 367	180	EC - 400
16	EC - 213	49	EC - 246	82	EC - 279	115	EC - 312	148	EC - 368	181	EC - 401
17	EC - 214	50	EC - 247	83	EC - 280	116	EC - 313	149	EC - 369	182	EC - 402
18	EC - 215	51	EC - 248	84	EC - 281	117	EC - 314	150	EC - 370	183	EC - 403
19	EC - 216	52	EC - 249	85	EC - 282	118	EC - 315	151	EC - 371	184	EC - 404
20	EC - 217	53	EC - 250	86	EC - 283	119	EC - 316	152	EC - 372	185	EC - 405
21	EC - 218	54	EC - 251	87	EC - 284	120	EC - 317	153	EC - 373	186	EC - 406
22	EC - 219	55	EC - 252	88	EC - 285	121	EC - 318	154	EC - 374		
23	EC - 220	56	EC - 253	89	EC - 286	122	EC - 319	155	EC - 375		
24	EC - 221	57	EC - 254	90	EC - 287	123	EC - 320	156	EC - 376		
25	EC - 222	58	EC - 255	91	EC - 288	124	EC - 321	157	EC - 377		
26	EC - 223	59	EC - 256	92	EC - 289	125	EC - 322	158	EC - 378		
27	EC - 224	60	EC - 257	93	EC - 290	126	EC - 323	159	EC - 379		
28	EC - 225	61	EC - 258	94	EC - 291	127	EC - 324	160	EC - 380		
29	EC - 226	62	EC - 259	95	EC - 292	128	EC - 325	161	EC - 381		
30	EC - 227	63	EC - 260	96	EC - 293	129	EC - 326	162	EC - 382		
31	EC - 228	64	EC - 261	97	EC - 294	130	EC - 350	163	EC - 383		
32	EC - 229	65	EC - 262	98	EC - 295	131	EC - 351	164	EC - 384		
33	EC - 230	66	EC - 263	99	EC - 296	132	EC - 352	165	EC - 385		
	Granja1		Granja 2		Granja 3		Granja 4				

Anexo 4. Lista de cepas positivas a gen *bla* $_{CTX-M}$

1	EC - 196	**34**	EC - 231	**67**	EC - 264	**100**	EC - 297	**133**	EC - 353	**166**	EC - 386
2	EC - 197	**35**	EC - 232	**68**	EC - 265	**101**	EC - 298	**134**	EC - 354	**167**	EC - 387
3	EC - 198	**36**	EC - 233	**69**	EC - 266	**102**	EC - 299	**135**	EC - 355	**168**	EC - 388
4	EC - 199	**37**	EC - 234	**70**	EC - 267	**103**	EC - 300	**136**	EC - 356	**169**	EC - 389
5	EC - 200	**38**	EC - 235	**71**	EC - 268	**104**	EC - 301	**137**	EC - 357	**170**	EC - 390
6	EC - 201	**39**	EC - 236	**72**	EC - 269	**105**	EC - 302	**138**	EC - 358	**171**	EC - 391
7	EC - 202	**40**	EC - 237	**73**	EC - 270	**106**	EC - 303	**139**	EC - 359	**172**	EC - 392
8	EC - 203	**41**	EC - 238	**74**	EC - 271	**107**	EC - 304	**140**	EC - 360	**173**	EC - 393
9	EC - 204	**42**	EC - 239	**75**	EC - 272	**108**	EC - 305	**141**	EC - 361	**174**	EC - 394
10	EC - 205	**43**	EC - 240	**76**	EC - 273	**109**	EC - 306	**142**	EC - 362	**175**	EC - 395
11	EC - 206	**44**	EC - 241	**77**	EC - 274	**110**	EC - 307	**143**	EC - 363	**176**	EC - 396
12	EC - 207	**45**	EC - 242	**78**	EC - 275	**111**	EC - 308	**144**	EC - 364	**177**	EC - 397
13	EC - 208	**46**	EC - 243	**79**	EC - 276	**112**	EC - 309	**145**	EC - 365	**178**	EC - 398
14	EC - 209	**47**	EC - 244	**80**	EC - 277	**113**	EC - 310	**146**	EC - 366	**179**	EC - 399
15	EC - 210	**48**	EC - 245	**81**	EC - 278	**114**	EC - 311	**147**	EC - 367	**180**	EC - 400
16	EC - 213	**49**	EC - 246	**82**	EC - 279	**115**	EC - 312	**148**	EC - 368	**181**	EC - 401
17	EC - 214	**50**	EC - 247	**83**	EC - 280	**116**	EC - 313	**149**	EC - 369	**182**	EC - 402
18	EC - 215	**51**	EC - 248	**84**	EC - 281	**117**	EC - 314	**150**	EC - 370	**183**	EC - 403
19	EC - 216	**52**	EC - 249	**85**	EC - 282	**118**	EC - 315	**151**	EC - 371	**184**	EC - 404
20	EC - 217	**53**	EC - 250	**86**	EC - 283	**119**	EC - 316	**152**	EC - 372	**185**	EC - 405
21	EC - 218	**54**	EC - 251	**87**	EC - 284	**120**	EC - 317	**153**	EC - 373	**186**	EC - 406
22	EC - 219	**55**	EC - 252	**88**	EC - 285	**121**	EC - 318	**154**	EC - 374		
23	EC - 220	**56**	EC - 253	**89**	EC - 286	**122**	EC - 319	**155**	EC - 375		
24	EC - 221	**57**	EC - 254	**90**	EC - 287	**123**	EC - 320	**156**	EC - 376		
25	EC - 222	**58**	EC - 255	**91**	EC - 288	**124**	EC - 321	**157**	EC - 377		
26	EC - 223	**59**	EC - 256	**92**	EC - 289	**125**	EC - 322	**158**	EC - 378		
27	EC - 224	**60**	EC - 257	**93**	EC - 290	**126**	EC - 323	**159**	EC - 379		
28	EC - 225	**61**	EC - 258	**94**	EC - 291	**127**	EC - 324	**160**	EC - 380		
29	EC - 226	**62**	EC - 259	**95**	EC - 292	**128**	EC - 325	**161**	EC - 381		
30	EC - 227	**63**	EC - 260	**96**	EC - 293	**129**	EC - 326	**162**	EC - 382		
31	EC - 228	**64**	EC - 261	**97**	EC - 294	**130**	EC - 350	**163**	EC - 383		
32	EC - 229	**65**	EC - 262	**98**	EC - 295	**131**	EC - 351	**164**	EC - 384		
33	EC - 230	**66**	EC - 263	**99**	EC - 296	**132**	EC - 352	**165**	EC - 385		

positivo

Anexo 5. Lista de cepas positivas a gen *bla* $_{TEM}$

1	EC - 196	34	EC - 231	67	EC - 264	100	EC - 297	133	EC - 353	166	EC - 386
2	EC - 197	35	EC - 232	68	EC - 265	101	EC - 298	134	EC - 354	167	EC - 387
3	EC - 198	36	EC - 233	69	EC - 266	102	EC - 299	135	EC - 355	168	EC - 388
4	EC - 199	37	EC - 234	70	EC - 267	103	EC - 300	136	EC - 356	169	EC - 389
5	EC - 200	38	EC - 235	71	EC - 268	104	EC - 301	137	EC - 357	170	EC - 390
6	EC - 201	39	EC - 236	72	EC - 269	105	EC - 302	138	EC - 358	171	EC - 391
7	EC - 202	40	EC - 237	73	EC - 270	106	EC - 303	139	EC - 359	172	EC - 392
8	EC - 203	41	EC - 238	74	EC - 271	107	EC - 304	140	EC - 360	173	EC - 393
9	EC - 204	42	EC - 239	75	EC - 272	108	EC - 305	141	EC - 361	174	EC - 394
10	EC - 205	43	EC - 240	76	EC - 273	109	EC - 306	142	EC - 362	175	EC - 395
11	EC - 206	44	EC - 241	77	EC - 274	110	EC - 307	143	EC - 363	176	EC - 396
12	EC - 207	45	EC - 242	78	EC - 275	111	EC - 308	144	EC - 364	177	EC - 397
13	EC - 208	46	EC - 243	79	EC - 276	112	EC - 309	145	EC - 365	178	EC - 398
14	EC - 209	47	EC - 244	80	EC - 277	113	EC - 310	146	EC - 366	179	EC - 399
15	EC - 210	48	EC - 245	81	EC - 278	114	EC - 311	147	EC - 367	180	EC - 400
16	EC - 213	49	EC - 246	82	EC - 279	115	EC - 312	148	EC - 368	181	EC - 401
17	EC - 214	50	EC - 247	83	EC - 280	116	EC - 313	149	EC - 369	182	EC - 402
18	EC - 215	51	EC - 248	84	EC - 281	117	EC - 314	150	EC - 370	183	EC - 403
19	EC - 216	52	EC - 249	85	EC - 282	118	EC - 315	151	EC - 371	184	EC - 404
20	EC - 217	53	EC - 250	86	EC - 283	119	EC - 316	152	EC - 372	185	EC - 405
21	EC - 218	54	EC - 251	87	EC - 284	120	EC - 317	153	EC - 373	186	EC - 406
22	EC - 219	55	EC - 252	88	EC - 285	121	EC - 318	154	EC - 374		
23	EC - 220	56	EC - 253	89	EC - 286	122	EC - 319	155	EC - 375		
24	EC - 221	57	EC - 254	90	EC - 287	123	EC - 320	156	EC - 376		
25	EC - 222	58	EC - 255	91	EC - 288	124	EC - 321	157	EC - 377		
26	EC - 223	59	EC - 256	92	EC - 289	125	EC - 322	158	EC - 378		
27	EC - 224	60	EC - 257	93	EC - 290	126	EC - 323	159	EC - 379		
28	EC - 225	61	EC - 258	94	EC - 291	127	EC - 324	160	EC - 380		
29	EC - 226	62	EC - 259	95	EC - 292	128	EC - 325	161	EC - 381		
30	EC - 227	63	EC - 260	96	EC - 293	129	EC - 326	162	EC - 382		
31	EC - 228	64	EC - 261	97	EC - 294	130	EC - 350	163	EC - 383		
32	EC - 229	65	EC - 262	98	EC - 295	131	EC - 351	164	EC - 384		
33	EC - 230	66	EC - 263	99	EC - 296	132	EC - 352	165	EC - 385		

positivo

Anexo 6. Distribución de cepas positivas al gen *bla*$_{CTX-M}$ en las 4 granjas muestreadas

	G1	G2	G3	G4
Nº de cepas positivas al gen ***bla*$_{CTX-M}$** / Total	11/25	3/25	11/25	0/25
% de cepas positiva al gen ***bla*$_{CTX-M}$**	44%	12%	44%	0%

Anexo 7. Distribución de cepas positivas al gen *bla*$_{TEM}$ en las 4 granjas muestreadas

	G1	G2	G3	G4
Nº de cepas positivas al gen ***bla*$_{TEM}$** / Total	34/124	21/124	36/124	33/124
% de cepas positiva al gen ***bla*$_{TEM}$**	27.4%	16.9%	29%	26.6%