Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Medicina Veterinaria
Unidad de Posgrado

Identificación de genes de resistencia bacteriana a antibióticos en restos fecales de cerdos de crianza intensiva a través de la metagenómica funcional

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Medicina y Cirugía Animal

AUTOR

Geraldine Kimberly MARCELO MONGE

ASESOR

Dr. Abelardo Lenin MATURRANO HERNÁNDEZ

Lima, Perú

2023



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

Marcelo, G. (2023). *Identificación de genes de resistencia bacteriana a antibióticos en restos fecales de cerdos de crianza intensiva a través de la metagenómica funcional*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Geraldine Kimberly Marcelo Monge
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	47389289
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-0754-3692
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Abelardo Lenin Maturrano Hernández
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	15725076
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-8819-7335
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Daphne Doris Ramos Delgado
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07607293
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Juan Anderson More Bayona
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	43316819
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Susana Mónica Gutiérrez Moreno
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08060631

Datos de investigación	
Línea de investigación	B.4.1.9. Patología clínica y biología molecular.
Grupo de investigación	No aplica.
Agencia de financiamiento	Perú. Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e innovación Tecnológica (CONCYTEC). Programa PROCIENCIA en el marco del concurso de "Proyectos de Investigación Básica 2018-01". Contrato N° 127-2018-FONDECYT.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: (Si se trata de una investigación en laboratorio, universidad, empresa o institución) País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: San Borja Avenida: Circunvalación 28 Latitud: -12.0808 Longitud: -76.9878
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Enero 2020 - Julio 2020
URL de disciplinas OCDE	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
UNIDAD DE POSGRADO

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS VETERINARIAS CON MENCIÓN EN MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL

En la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo las 10:00 horas del día lunes 11 de diciembre del 2023, el Jurado Examinador de Tesis de Grado de Magíster, presidido por la Dra. Daphne Doris Ramos Delgado y conformado por los siguientes miembros docentes: Ph.D. Juan Anderson More Bayona, Dra. Susana Gutiérrez Moreno y Dr. Abelardo Lenin Maturrano Hernández (**Asesor),** se dio inicio a la sustentación oral y pública de la Tesis intitulada:

"Identificación de genes de resistencia bacteriana a antibióticos en restos fecales de cerdos de crianza intensiva a través de la metagenómica funcional", presentado por la Bachiller:

GERALDINE KIMBERLY MARCELO MONGE

Quien sustentó la Tesis para obtener el Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Medicina y Cirugía Animal y absolvió satisfactoriamente las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado y practicada la votación obtuvo la calificación de: **_____MUY BUENO, (18) DIECIOCHO _____**

A continuación, el Jurado por intermedio de su Presidente recomendó a la Unidad de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria, proponga el otorgamiento del Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Medicina y Cirugía Animal, a la Bachiller Geraldine Kimberly Marcelo Monge.

Siendo las 11:30 horas del día lunes 11 de diciembre de 2023, se dio por concluido el acto académico, suscribiéndose la presente Acta.

Dra. Daphne Doris Ramos Delgado (P.A.D.E.)
Presidente

Ph.D. Juan Anderson More Bayona (P.Au. T.C.)
Miembro

Dra. Susana Mónica Gutiérrez Moreno (P.P.T.C)
Miembro

Dr. Abelardo Lenin Maturrano Hernández (P.P.T.C.)
Miembro (Asesor)

Dr. César Miguel Gavidia Chucán (P.P.D.E.)
Director de la Unidad de Posgrado UNMSM

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Abelardo Lenin Maturrano Hernández en mi condición de asesor acreditado con la Resolución Directoral N°035-UPG-FMV-2021 de la tesis, cuyo título es **Identificación de genes de resistencia bacteriana a antibióticos en restos fecales de cerdos de crianza intensiva a través de la metagenómica funcional,** presentado por la bachiller Geraldine Kimberly Marcelo Monge para optar el grado académico de Magister en Ciencias Veterinarias con mención en Medicina y Cirugía Animal, CERTIFICO que se ha cumplido con 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 8% 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 grado/ título/ especialidad correspondiente.

Firma del Asesor _____

DNI: 15725076

Nombres y apellidos del asesor: ABELARDO LENIN MATURRANO HERNANDEZ



DEDICATORIA

Primeramente, a Dios por guiarme a cada paso que doy en mi vida y cuidar de mis seres queridos. A mis padres por su apoyo incondicional y por inculcarme los valores que tengo y que me han servido para mejorar cada día, junto a todas mis hermanas. Dedicado también a mi reciente familia, mi esposo y mi hijo gracias a los cuales me he encaminado a ser mejor cada día en todo lo que me proponga. A un ángel que siempre cuidara a mi familia, mi amada Khalessi, quien nos acompañó durante sus cortos 7 meses de vida, iluminaste nuestras vidas.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Lenin Maturrano por darme la oportunidad de pertenecer al Laboratorio de Biología y Genética Molecular de la UNMSM. y llevar a cabo mi trabajo de investigación.

Al Dr Luis Luna, quien me ha brindado su apoyo incondicional y asesoría constante.

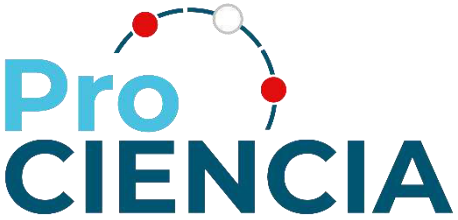
Al Dr. Raúl Rosadio, por sus consejos y gran cariño.

A mis padres por no dejar de alentarme en todo lo que desarrollo en la vida.

A mis hermanas, Patricia, Cynthia, Connie, Alexandra y Alondra, quienes siempre me acompañaron con su amor incondicional.

A mi esposo por darme un poco de tiempo para dedicarme a leer e investigar acerca de este trabajo.

Este proyecto fue subvencionado por el CONCYTEC a través del Programa PROCIENCIA en el marco del concurso de "Proyectos de Investigación Básica 2018-01", según contrato N° 127-2018-FONDECYT.





ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE	iv
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Resistencia a antibióticos a través de los años	3
2.2. Uso de antibióticos en la salud humana y animal	4
2.3. Morfología básica bacteriana	5
2.4. La microbiota intestinal en animales	5
2.5. Herramientas moleculares para la identificación de microorganismos	6
2.5.1. Secuenciamiento.	6
2.5.2. Metagenómica.	7
2.5.3. Aplicaciones de la secuenciación masiva en microbiología	8
2.5.3.1. Diagnóstico etiológico de las enfermedades infecciosas	8
2.5.3.2. Detección de mecanismos de resistencia a los antibióticos	9
2.5.3.3. Detección de genes de virulencia	9
2.5.3.4. Detección de integrones, trasposones, plásmidos y bacteriófagos	10
2.5.3.5. Tipificación molecular	10
i. MLST	11
ii. MLST en *Escherichia coli*	12

iii. Clasificación de filogrupos 12

2.6. Genes de resistencia en animales 13

2.6.1. Genes de resistencia a antimicrobianos en bacterias Gram negativas 15

2.6.2. Genes de resistencia a antimicrobianos en bacterias Gram positivas 16

2.7. Clasificación de antibióticos en base a su mecanismo de acción 17

2.7.1. Antibióticos betalactámicos 17

2.7.2. Antibióticos quinolonas 17

2.7.3. Antibióticos tetraciclinas 17

2.7.4. Antibiótico cloranfenicol 18

2.7.5. Antibiótico trimetropin- sulfametoxazol 18

2.7.6. Antibióticos polimixinas 18

2.8. Base genética de resistencia antimicrobiana 19

2.8.1. Resistencia natural 19

2.8.2. Resistencia adquirida 19

2.8.3. Resistencia cruzada 21

2.8.4. Multidrogo resistencia y otros tipos de resistencia 22

2.9. Mecanismos de resistencia antibiótica 22

2.9.1. Modificaciones de la molécula antimicrobiana 23

2.9.2. Disminución de la penetración y extrusión del compuesto antimicrobiano 23

2.9.3. Cambios o elusión de los sitios objetivo 23

2.9.4. Resistencia debido a adaptación global celular 24

2.9.5. Inactivación enzimática de antibióticos 24

2.10. Genes de resistencia en producción animal 24

2.10.1. El uso de antibióticos en la industria del cerdo y su efecto en el resistoma fecal 25

2.11. Medidas de control, vigilancia, normas y efectos de los genes de resistencia en bacterias drogorresistentes 27

III. MATERIALES Y MÉTODOS 28

3.1. Lugar de ejecución y periodo de duración 28

3.2. Metodología 29

3.2.1. Aislamiento de *E. coli* 29

3.2.2. Antibiograma 29

3.2.3. Extracción de ADN de los aislados de *E. coli* 31

3.2.4. PCR para la detección del gen *mcr-1* 31

3.2.5. Secuenciamiento genómico 31

3.2.5.1. Preparación de librerías y secuenciamiento 31

3.2.5.2. Análisis bioinformático 32

3.2.5.3. Análisis de las secuencias 32

IV. RESULTADOS 33

4.1. Análisis de los aislados de *E. coli* por antibiograma 34

4.2. Secuenciamiento de aislados de *E. coli* y determinación del resistoma 36

4.3. Código de acceso de las secuencias 36

V. DISCUSIÓN 43

VI. CONCLUSIONES 51

VII. BIBLIOGRAFÍA 52

ANEXO 1 77

ANEXO 2 79

ANEXO 3 80

RESUMEN

La resistencia a antibióticos es ya un problema actual que concierne tanto la salud humana como la salud en general. Gran parte de estos genes de resistencia se diseminan hacia las regiones urbanas a través de bacterias presentes en la microbiota de animales sometidos a producción intensiva, como la producción de cerdos. Por lo que, en el presente estudio, se analizaron aislados de *Escherichia coli* procedentes de muestras de heces de cerdos sometidos a producción intensiva de granjas localizadas en el departamento de Lima, específicamente de la provincia de Huaral. 87 aislados de *E. coli* fueron analizados por antibiograma mediante la prueba de Kirby Bauer y mediante PCR para la identificación del gen *mcr1*. Posteriormente se seleccionaron 17 aislados de *E. coli* en base a su multirresistencia a diversos antibióticos y a la presencia del gen *mcr1*, secuenciándose un total de 17 genomas de *E. coli*. En estos genomas, fueron hallados una gran cantidad y diversidad de genes de resistencia a antibióticos (ARGs), destacándose, además del gen *mcr1*, relacionado con resistencia a colistina, el gen $bla_{CTX\text{-}M\text{-}55}$, el cual confiere resistencia a cefalosporinas de 3ra generación, como la ceftriaxona, un antibiótico ampliamente utilizado en medicina humana. Otros ARGs importantes identificados en este estudio, fue el *fosA3*, relacionado con resistencia a fosfomicina, diversos genes de la familia *qnr*, que confieren resistencia a quinolonas, genes de la familia *tet*, que confieren resistencia a tetraciclinas, de la familia *sul*, de resistencia a sulfonamidas y una amplia diversidad de genes de resistencia a aminoglucósidos. La información generada resulta de vital importancia como evidencia de la diseminación de genes de gran importancia en salud pública, debiéndose tomar medidas que eviten esta dispersión de bacterias portadoras de estos genes a ambientes urbanos.

Palabras clave: Genes de resistencia a antibióticos, microbiota, gen *mcr1*.

ABSTRACT

Antibiotic resistance is already a current problem that concerns both human health and health in general. A large part of these resistance genes spread to urban regions through bacteria present in the microbiota of animals subjected to intensive production, such as pig production. Therefore, in the present study, *Escherichia coli* strains isolated from fecal samples of pigs subjected to intensive production from farms located in the department of Lima, specifically from the province of Huaral, were analyzed. The strains were tested for their antibiotic susceptibility by Kirby Bauer method and for the *mcrI* gene presence by PCR. After that, 17 *E. coli* strains were selected to be sequenced because of their antibiotic multiresistance and *mcrI* gene presence. In these genomes, a large number and diversity of antibiotic resistance genes were found, additionally to the *mcr1* gene, related to colistin resistance, the $bla_{CTX\text{-}M\text{-}55}$ gene, which confers resistance to 3rd generation cephalosporins, such as ceftriaxone, an antibiotic widely used in human medicine. Other important antibiotic resistance genes identified in this study were *fosA3*, related to resistance to fosfomycin, various genes of the *qnr* family, which confer resistance to quinolones, genes of the *tet* family, which confer resistance to tetracyclines, of the *sul* family, for sulfonamide resistance and a wide diversity of aminoglycoside resistance genes. As a conclusion, these results can be used as evidence of the dissemination of genes of great importance in public health, and measures must be taken to prevent this spread of bacteria carrying these genes to urban environments.

Key words: Antibiotic resistance genes, microbiota, *mcr1* gene.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Genes de resistencia a antibióticos (ARGs) detectados en ADN de fagos ambientales…….14

Cuadro 2. Ejemplos de genes codificantes de carbapenemasas encontrados en bacterias Gram-negativas desde animales……15

Cuadro 3. Ejemplos comunes de genes de resistencia antimicrobiana encontrados en *Clostridium*, *Enterococcus* y *Staphylococcus*……...16

Cuadro 4: Granjas de producción intensiva de cerdos considerados en este estudio, muestras recolectadas por granjas y *pooles* formados……...…..29

Cuadro 5: Antibióticos usados en la prueba de Kirby Bauer y diámetros de halo para determinar resistencia y sensibilidad en *Enterobacterias* según CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)…….30

Cuadro 6: Resumen de aislados de *E. coli* analizados y secuenciados por granja de procedencia, así como información sobre la clasificación por filogrupos y de MLST de las secuencias obtenidas……...33

Cuadro 7. Perfil de resistencia antibiótica de los aislados de *E. coli* seleccionados para secuenciamiento…….37

Cuadro 8. Perfil de resistencia antibiótica de los aislados secuenciados y presencia del gen *mcr*…….38

Cuadro 9. Filogrupo, grupo MLST y genes de resistencia identificados en los aislados de *E. coli* multirresistentes procedentes de cerdos……..39

Cuadro 10. Diversidad de genes de resistencia a antibióticos representados en términos de cantidad de genes y frecuencia de ellos en las secuencias de *E. coli*…….....41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perfil de resistencia/intermedio/sensibilidad a antibióticos de los aislados de *E. coli* analizados en la granja 1……34

Figura 2. Perfil de resistencia/intermedio/sensibilidad a antibióticos de los aislados de *E. coli* analizados en la granja 2……35

Figura 3. Perfil de resistencia/intermedio/sensibilidad a antibióticos de los aislados de *E. coli* analizados en la granja 3……35

I. INTRODUCCIÓN

Desde hace muchos años, la crianza de animales de forma intensiva para consumo humano ha ido creando y adaptando programas de engorde y mejoramiento animal mediante el uso de antibióticos, solo con la mentalidad a corto plazo, que contribuye con una crisis de salud de gran magnitud (Giguere *et al*., 2007; Hollis y Ahmed, 2013; Danish Agriculture and Food Council, 2018). Siendo reflejado, por ejemplo, en granjas de producción de cerdos, las cuales vienen usando concentraciones bajas de antibióticos de forma masiva como promotores del crecimiento de animales, profiláctico y para el tratamiento de enfermedades infecciosas comunes, contribuyendo así a la extensión de la resistencia a antibióticos (Giguere *et al*., 2007; Hollis y Ahmed, Sawant *et al*., 2005).

La repercusión en la salud pública a nivel mundial debido al uso indiscriminado de antibióticos ha promovido la ineficacia terapéutica de los mismos frente a diferentes enfermedades infecciosas en humanos, pese a que inicialmente tuvo gran importancia para el control de enfermedades incrementando en varios años la esperanza de vida promedio de la población (Lozano *et al*., 2010; Cars *et al*., 2008; Calvo y Martínez, 2009). Los cerdos son particularmente una de las especies de mayor estudio, debido a que su carne es una de las más consumidas, representando cerca del 33% de la producción de carne a nivel mundial (FAOSTAT, 2020).

El microbioma intestinal de cerdos de producción presenta al menos 10 especies más comunes entre las cuales se encuentra el *Lactobacillus reuteri, Lactobacillus johnsonii, Lactobacillus amylovorus, Ruminococcaceae bacterium, Escherichia coli, Prevotella copri, Bacteroides fragilis, Streptococcus suis, Phascolarctobacterium succinatutens,* y *Salmonella entérica,* las cuales varían en cantidad en cada segmento intestinal (Yang *et al*., 2016). Durante el desarrollo del animal, la estructura del microbioma intestinal se ha demostrado que permanece casi inalterable durante toda la vida del animal, excepto durante la época del destete,

sin embargo, en la disbiosis ocurren cambios drásticos en la microbiota intestinal, los cuales ocurren durante periodos de estrés patológico y durante el tratamiento terapéutico con antibióticos, los microorganismos intestinales quedan expuestos a un ambiente nocivo para estos, lo que puede provocar una disbiosis, y así contribuir a la infección con otros patógenos (Holman *et al*., 2015).

Para el estudio más amplio de la resistencia a antibióticos por parte de bacterias en animales y en el medio ambiente al cual están expuestos, se recurre al uso de la metagenómica funcional, la cual permite el aislamiento, identificación y análisis de los genes de resistencia a antibióticos (ARGs), sus orígenes, reservorios y movimientos entre especies bacterianas, animales o ecosistemas (Forsberg *et al*., 2012; Gibson *et al*., 2015; Handelsman *et al*., 1998).

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Resistencia a antibióticos a través de los años

La resistencia a antibióticos es definida de manera sencilla como la capacidad de un microorganismo de tolerar concentraciones de antibióticos clínicamente relevantes, siendo un tema de preocupación en varios aspectos a nivel mundial, llamando más la atención por el desafío al que ha conllevado a partir del siglo 21, pese a que han salvado millones de vidas en el mundo y conllevado a una revolución en la medicina, así también por la contribución sobre el progreso en campos médicos como en casos de trasplantes de órganos, progenitores hematopoyéticos, entre otros, donde las infecciones son especialmente prevalentes e importantes (Choffnes *et al*., 2010; Lai *et al*., 2022; Vélez y Sloand, 2016; Pagalilauan y Limaye, 2013).

La resistencia a la penicilina se desarrolló desde los años 1940s, luego del uso que se dio a gran escala de este antibiótico, siendo un desafío evitar el uso indiscriminado en el cuidado de la salud. El campo de la medicina no es la única que se ha visto afectada por la resistencia antimicrobiana, sino también la agricultura, ganadería y acuicultura que son afectados también por el gran y continuo uso de antibióticos, conllevando a la selección de poblaciones bacterianas ambientales (Barbosa and Levy, 2000; Van Boeckel *et al*., 2015; von Wintersdorff *et al*., 2016).

En los años cincuenta se comenzó a usar antibióticos como promotores del crecimiento de animales, observándose que aves alimentadas con productos procedentes de la fermentación de *Streptomyces aureofaciens,* mejoraban su desarrollo (Torres y Zarazaga, 2002). Años más tarde, tuvieron que regular el uso de antibióticos en general en animales de consumo humano, pese a ello hubo cepas que tenían un alto nivel de resistencia (Aarestrup, 1995; Bates, 1994).

El uso extensivo de antibióticos en medicina humana y veterinaria está tomando un papel de principal factor que acelera la aparición y dispersión de bacterias con genes de resistencia a nivel mundial (FAO, 2016; Goossens *et al.*, 2005), Como ejemplo, solo en Estados Unidos se emplearon 3 000 toneladas de antibióticos en humanos en 2009 y 13 000 toneladas en animales en 2010, siendo usados principalmente como promotores de crecimiento (Spellberg *et al*., 2013).

En el intestino humano y de los animales existe una alta densidad bacteriana, lo que lo hace un lugar especialmente adecuado para el intercambio de genes entre bacterias de una misma especie o de distintas especies y selección de bacterias resistentes a antibióticos (Salyers y Schlessinger, 2007). También es importante considerar el origen ambiental de estos genes de resistencia a antibióticos, pudiendo evolucionar una vez adquiridos por bacterias patógenas o comensales del hombre o de animales.

2.2. Uso de antibióticos en la salud humana y animales de producción

Los ganaderos y veterinarios han venido siendo usualmente los responsables en la implementación de medidas preventivas contra enfermedades o de administrar antibióticos, pese a que existen diferentes métodos para prevenir, reducir y controlar grandemente la carga de muchas enfermedades en animales sin necesariamente el uso de antibióticos en animales de producción, por ello aun viene estando en desarrollo la implementación de maneras más efectivas de gestión (LeBlane *et al*., 2006; Rsuton *et al*., 2016).

Una posible amenaza en la salud humana resultado del uso inadecuado de antibióticos en animales de consumo es exponencial, debido a que los organismos resistentes a antibióticos propagados en el ganado están a punto de ingresar al suministro de alimentos y podrían diseminarse ampliamente (Garofalo *et al*., 2007; Ramchadani *et al*., 2005). Las bacterias comensales encontradas en el ganado están frecuentemente presentadas en los productos de carne fresca y pueden servir como reservorio de genes de resistencia que pueden potencialmente ser transferidos a organismos patógenos en humanos (Mena *et al*., 2008; Diarrassouba *et al*., 2007).

Los cerdos domésticos proveen la mayor parte de la carne para consumo humano, después de las aves, y son también usados como modelos para estudios de investigación biomédica, el tracto gastrointestinal de esta especie posee trillones de bacterias, las cuales juegan un rol vital en metabolismo, inmunidad e incluso en el comportamiento del hospedador, existiendo diversos estudios que reportan una asociación entre la microbiota intestinal y la eficiencia de la alimentación ofrecida (Lunney, 2007; Tremaroli y Backhed, 2012; Thaiss *et al*., 2016; FAOSTAT, 2020).

2.3 Morfología básica bacteriana

Las bacterias son un grupo de microorganismos de amplia diversidad, que se diferencian en tamaño, forma, hábitat y metabolismo (De Pedro *et al*., 2.003). Son microorganismos procariotas que llevan su información genética en una molécula de ADN de doble cadena circular. La clasificación de bacterias Gram positivas o gram negativas se basan en las características de su pared celular (Doron y Gorbach, 2008).

La pared celular es compleja, presente en bacterias Gram positivas, en forma de malla que en muchas bacterias es importante por el mantenimiento de su forma e integridad estructural, siendo ésta objetivo de muchos potentes antibióticos (Schneider y Sahl, 2010). Conociéndose también que los fragmentos de la pared bacteriana tienen propiedades inmunoestimulantes y citotóxicas jugando un importante papel en la patogénesis y la enfermedad misma (Royet *et al*., 2011; Sorbara y Philpott, 2011; Jutras *et al*., 2019).

Los lipopolisacáridos (LPS) son moléculas que constituyen a las llamadas endotoxinas, presentes en la membrana externa (ME) de bacterias Gram negativas, tales como las bacterias *Escherichia coli, Salmonella,* enterobacterias como *Yersinia o Shiguellae, Enterobacter,* entre otras (Minabe *et al*., 1994). La ME contiene canales denominados porinas, los cuales permiten el ingreso de varias moléculas como las drogas.

La membrana citoplasmática previene el flujo de iones dentro o fuera de la célula bacteriana y mantiene los componentes citoplasmáticos y componentes bacterianos en un espacio determinado, tales como proteínas y otras macromoléculas. El espacio entre la ME y la membrana citoplasmática se denomina periplasma (Houser, 2015; Strelkauskas *et al*., 2010).

2.4. La microbiota intestinal en animales

La microbiota intestinal se encuentra estrechamente relacionada al metabolismo energético, el desarrollo del sistema inmune, y otras funciones físicas de importancia (Clemente *et al*., 2012; Gilbert *et al*., 2018; Tremaroli y Backhed, 2012).

El mayor crecimiento bacteriano desde el tejido gastrointestinal ha sido de tipo Gram positivo, siendo los géneros principalmente identificados el *Streptococcus, Eubacterium, Lactobacillus, Clostridium y Propionobacterium*, siendo estos resultados variables, debido al medio usado para el cultivo y el sitio muestreado (Robinson *et al*., 1981).

La población microbiana también incluye organismos que causan enfermedades tales como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Clostridium perfringens*, estos pueden causar una

morbilidad sustancial y mortalidad, siendo usados antibióticos de manera profiláctica en la industria pecuaria, el cambio de la microbiota de manera brusca durante la crianza puede incrementar drásticamente el riesgo de enfermedad (Qiao *et al*., 2015; Pieper *et al*., 2010).

2.5 Herramientas moleculares para la identificación de microorganismos

La introducción de los métodos moleculares en la identificación y caracterización de microorganismos se debió a que se necesitaba un diagnóstico rápido y directo en contraste con los métodos tradicionales de microbiología, que demandan tiempo. Los primeros métodos de identificación molecular fueron la hibridación de ADN, el análisis de secuencias del ADNr 16S, la hibridación con una sonda específica y el análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) o ribotipificación. La identificación molecular se basa en la composición constitutiva de los ácidos nucleicos más que en los productos de su expresión, usualmente asociado a la identificación de microbiológica convencional (Foley y Grant, 2007; Ward y Roy, 2005).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la clonación, la secuenciación, la tecnología de detección mediante fluoresceína y la disponibilidad de información en los últimos años permitió una evolución en el desarrollo de las nuevas herramientas moleculares cuya utilidad es la de detectar y cuantificar bacterias patógenas en agua y alimentos (Ward y Roy, 2005; Beneduce *et al.*, 2007). Sin embargo, una de las limitantes de las técnicas moleculares es que aún no están completamente estandarizadas, por lo cual en algunos casos resultan inadecuadas (Pfaller, 2001).

2.5.1 Secuenciación

Se sabe poco sobre la microbiota intestinal de cerdo en comparación con la de los humanos, pese a que varios artículos utilizan principalmente la secuenciación del gen 16S rRNA o la secuenciación metagenómica (Fox *et al*., 1980; Schuster, 2008). El sistema de designación taxonómica se basa en secuencias únicas con estas moléculas y proporcionan un genotipo en lugar de un medio fenotípico para buscar bacterias (Nocker *et al*., 2007).

Los métodos para la caracterización del microbioma en cerdos han sido divididos en 3 categorías (Simpson *et al*., 1991, 2002):

- Métodos físicos basados en la diferencia en la secuencia del gen 16S rRNA.
- Amplificación por PCR del gen 16S rRNA, seguido por la clonación y secuenciación del genoma completo.

- Amplificación por PCR de una secuencia variable del gen 16S rRNA, seguido por la secuenciación de ADN de siguiente generación de alto rendimiento.

Se han secuenciado completamente genomas bacterianos de múltiples patógenos de interés clínico y veterinario, y continúan realizándose a un ritmo acelerado debido a la mayor capacidad de procesamiento de la información que brindan las tecnologías moleculares como la secuenciación de última generación (Jolley, 2012). La secuenciación de Sanger es una tecnología que se usó ampliamente inicialmente y por muchos años, siendo reemplazada por tecnologías más avanzadas como la secuenciación de última generación, divididos en segunda y tercera generación (Heather y Chain, 2016).

Secuenciamiento de segunda generación

Es caracterizada por hacer lecturas de cortos segmentos de ADN que posteriormente son alineados a genomas referenciales y empalmados para generar la secuencia completa (Kchouk *et al*., 2017; Van Dijk *et al*., 2018). Una de las tecnologías de secuenciación es la pirosecuenciación la cual se basa en la detección de la liberación de pirofosfato durante la síntesis de ADN, desarrollada a finales del año 1990. Actualmente, esta tecnología viene siendo reemplazada en gran medida por tecnologías más avanzadas de secuenciación de última generación, que ofrecen mayor rendimiento (Arney, 2021; Mashayekhi y Ronaghi, 2007).

Secuenciamiento de tercera generación

Se secuencian nucleótidos uno a uno, sin amplificación y en tiempo real, obteniendo así fragmentos largos, usando menos recursos bioinformáticos y obtiene menos sesgos que en la secuenciación de segunda generación (Van Dijk *et al*., 2018; Ambardar *et al.*, 2016). Su uso es mayormente dado en marcadores epigenéticos, transcriptómica y metagenómica.

2.5.2. Metagenómica

La metagenómica es una metodología que se ha desarrollado en los últimos años, que ha permitido la identificación de genomas aislados de su entorno natural, sin el requerimiento de separar y cultivar a cada una de las especies que componen la comunidad, permitiendo el estudio de las funciones y roles biológicos de los microorganismos (Nielsen *et al*., 2014; Wooley *et al* 2010; Chiu y Miller, 2019; Eyre, 2022).

La amplificación y secuenciación del gen ARN ribosomal 16S, utilizado como marcador taxonómico universal en arqueas y bacterias, del ADN extraído directamente de comunidades microbianas naturales, permitió encontrar una gran diversidad de microorganismos que

pertenecen a grupos taxonómicos no descritos con anterioridad a nivel del *phylum* (Pace *et al.*, 1985; Escalante, 2007).

El secuenciamiento del genoma completo (SGC) y la metagenómica utilizan diferentes enfoques para la determinación del contenido genómico de una muestra, mientras que el SGC tiene como objetivo secuenciar el genoma completo en una sola colonia bacteriana, la secuenciación de marcadores basados en amplicones o metagenómica de escopeta se centra en las comunidades microbianas dentro de la muestra, generalmente sin cultivo (Chiu y Miller, 2019; Eyre, 2022).

En los últimos años, el desarrollo y mejor costo de tecnologías de secuenciación de escopeta o la pirosecuenciación ha permitido el análisis metagenómico amplio. Las principales ventajas de los métodos mencionados versus las técnicas tradicionales de amplificación genética son el menor error taxonómico de la secuenciación y la capacidad de analizar de manera simultánea el complemento taxonómico y funcional de una misma comunidad (Auchtung *et al.*, 2006; Magurran, 1998).

Es importantes conocer que para un análisis metagenómico un paso crucial es la extracción de ADN, la cual debe ser selectiva para asegurar una buena sensibilidad y eficiencia, basándose en métodos de lisis diferencial que, de acuerdo con la muestra clínica, ya que no solo habrá depleción de ADN humano o animal, sino que también afectará a todo el ADN que se encuentre libre independientemente de su origen (O' Neil *et al.,* 2013; Gu *et al.,* 2016; Thoendel *et al.,* 2016).

2.5.3. Aplicaciones de la secuenciación masiva en microbiología

2.5.3.1. Diagnóstico etiológico de las enfermedades infecciosas

El uso de las técnicas tradicionales para el diagnóstico microbiológico de infecciones de tipo directo o indirecto presenta limitantes de tiempo e incluso ineficientes para el establecimiento del agente etiológico definitivo, incluso el uso de técnicas diagnósticas basadas en la PCR ya está siendo limitadas debido a la necesidad de una sospecha de la etiología del patógeno.

La secuenciación Sanger presenta una baja tasa de error para el diagnóstico etiológico de las enfermedades infecciosas cuando se trata de solo un agente etiológico, y se ha usado ampliamente para la clasificación taxonómica. Este problema sí puede ser abordado mediante técnicas de secuenciación masiva con la adición de amplicones de los oligonucleótidos necesarios para su identificación y fijación sobre la superficie, donde se producirá la secuenciación, estrategia frecuentemente utilizada para estudios de la microbiota. Así mismo, se ha demostrado una alta sensibilidad incluso con ADN altamente degradado (Rassoulian *et al.*, 2020).

Actualmente, disponemos de herramientas de análisis que nos permiten identificar las especies implicadas en una infección a partir de lecturas procesadas o contigs. Disponibles en algunos casos en servidores de internet que resultan fáciles de utilizar y que prácticamente no requieren de experiencia bioinformática, tales como KmerFinder, megaBLAST, PathoScope 2.0 (Hasman *et al.*, 2014; Larsen *et al.*, 2014; Chen *et al.,* 2015).

2.5.3.2. Detección de mecanismos de resistencia a los antibióticos

La resistencia a antibióticos está codificada en el genoma bacteriano, por lo que la aplicación de la secuenciación masiva tiene el potencial de predecir el fenotipo de un microorganismo dado. Siendo importante sobre todo en aquellos microorganismos de crecimiento lento o imposibles de cultivar (Su, 2019).

Se han desarrollado numerosos modelos para la predicción de la resistencia en diversas bacterias tales como en *Mycobacterium tuberculosis*, mostrando especificidades y sensibilidades de hasta el 100% para algunos antibióticos, en patógenos Gram-negativos como *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Neisseria gonorrhoeae, Acinetobacter baumannii* o *Pseudomonas aeruginosa*, demostrando una buena sensibilidad y especificidad (>90%). Así también, en especies Grampositivas donde también se encuentran como modelos para la predicción de la resistencia en importantes patógenos al *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus pneumoniae* (Bradley *et al.,* 2015; Pankhurst *et al.,* 2016; Moradigaravand *et al.,* 2018; Mason *et al.*, 2018).

Es probable que en adelante los modelos basados en análisis de secuencias de genoma completo sean utilizados en los servicios de microbiología clínica como herramienta para la predicción de la sensibilidad antibiótica, complementando las técnicas llamadas actualmente como "gold standard" (Ellington *et al.*, 2017).

2.5.3.3. Detección de genes de virulencia

Las bacterias poseen un potencial infeccioso llamado virulencia, siendo determinada por factores relacionados al sistema inmune del hospedador y por los factores de virulencia presentes en el genoma del microorganismo causante de la infección. Como ejemplo el *S. aureus,* es un patógeno capaz de producir diferentes infecciones, mediante factores de virulencia, siendo una de las mismas la leucocidina, enterotoxinas y exfoliatinas. Por otro lado, *S. pneumoniae* tiene la capacidad de producir infecciones graves como la meningitis mediada también de gran manera por algunos factores de virulencia (Shettigar y Murali, 2020; Lees *et al.*, 2019).

Recientemente, diversas investigaciones han generado millones de secuencias de genomas completos que revelan una enorme diversidad genética intra e interespecie, siendo analizados

mediante genómica comparativa ampliando el conocimiento ya existente sobre los elementos genéticos responsables de los fenotipos de virulencia observados (Allen *et al.*, 2021).

2.5.3.4. Detección de integrones, transposones, plásmidos y bacteriófagos

La transferencia horizontal de moléculas de ADN entre células procariotas ha permitido la evolución bacteriana, dependiendo de una serie de elementos genéticos móviles especializados, entre los que se incluyen transposones, plásmidos y ciertos bacteriófagos, y también de estructuras capaces de albergar y reclutar genes de resistencia denominados integrones. La secuenciación masiva como herramienta para la detección de los determinantes de resistencia y virulencia, es capaz de detectar y conocer el entorno genético de todos los elementos presentes en una sola prueba (Frost *et al.*, 2005).

2.5.3.5 Tipificación molecular

Las técnicas de tipificación se han clasificado tradicionalmente en fenotípicas que se basan en las características bioquímicas o fisiológicas de los microorganismos y las técnicas moleculares, basadas en el estudio del ADN. Estas últimas, tienen como fin determinar si dos o más aislados tienen relación genética, utilizándose para estudios filogenéticos, por ende, en la vigilancia epidemiológica global e investigación de brotes (Singh *et al.*, 2006; Blanc, 2004; Foley *et al.*, 2009).

El desarrollo de la biología molecular dio paso a técnicas de tipificación basadas en la restricción del ADN, más reproducibles, resolutivas, más rápidas y menos laboriosas. La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE, por sus siglas en inglés) ha sido considerada como el "gold standard" para analizar todo el genoma bacteriano, pero la complejidad de la técnica y la difícil comparación de los resultados entre laboratorios promovió el desarrollo de numerosas técnicas de tipificación basadas en la PCR, habiéndose posicionado el análisis de tipificación multilocus de secuencias (MLST, por sus siglas en inglés) (Chan, 2001).

i. MLST

El análisis MLST se ha convertido en el análisis molecular de elección, que se encarga de amplificar y secuenciar fragmentos del genoma de genes constitutivos. Maiden *et al*., 1998, desarrolló esta metodología, la cual está basada en la secuenciación de fragmentos de siete genes conservados que no están sometidos a presión selectiva, permitiendo la identificación de variaciones en los diferentes locus detectando de forma directa mediante el análisis de las secuencias obtenidas, permitiendo la identificación de grupos de microorganismo con genotipos idénticos o muy relacionados. Este análisis es muy útil en aplicaciones epidemiológicas como la identificación y rastreo de cepas relacionadas con un brote de una enfermedad infecciosa (Mellman *et al*., 2011), así como un sistema de clasificación de aislados en un contexto global (Heym *et al.*, 2002).

Históricamente, este procedimiento se realizó por primera vez en aislados de *Neisseria meningitidis* en 1998, en respuesta a que las técnicas de tipificación que precedieron al análisis MLST eran poco reproducibles entre laboratorios (Maiden *et al*., 1998). Básicamente, el fundamento de la técnica es el secuenciamiento de aproximadamente 400 - 500 pb de múltiples genes constitutivos o *housekeeping*. los cuales, según la combinación de las mutaciones o sustituciones de simple nucleótidos (SNPs) presentes en estas secuencias generarán un perfil alélico al cual se le designa un número de secuencia, llamado también secuenciotipo (ST). A esta técnica se le considera como un "gold standard" de tipificación, siendo desarrollados diversos protocolos para tipificar diversos microorganismos bacterianos (Aanensen y Spratt, 2005). Todos los perfiles MLST generados a nivel mundial se almacenan en bases de datos disponibles para todo el mundo, como la base de datos PubMLST (http:/pubmlst.org).

Tradicionalmente, la técnica MLST comienza con una amplificación previa por PCR utilizando primers específicos para los genes especificados en un esquema MLST, seguido de la obtención de las secuencias de los productos de PCR por secuenciación Sanger. Este procedimiento puede tomar mucho tiempo y es costoso. Ahora es posible obtener las secuencias completas de un genoma completo usando técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) de forma rápida y barata (Service, 2006), y a partir de la información genómica se extrae la información relevante para inferir el ST de una secuencia procedente de un aislado bacteriano, para lo cual se dispone de múltiples herramientas bioinformáticas que permiten determinarlo.

ii. MLST en *Escherichia coli*

En el esquema de tipificación para la bacteria *E. coli*, se incluyen 7 genes constitutivos o housekeeping, que se muestran a continuación:

Gen	Nombre
adk	adenilato kinasa
fumC	fumarato hidratasa
gyrB	ADN girasa
icd	isocitrato deshidrogenasa
mhd	malato deshidrogenasa
purA	adenilosuccinato sintetasa
recA	motivo de unión a adenosina/guanosina trifosfato

Fuente: https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst_mlst_seqdef&page=schemeInfo&scheme_id=4

Hasta el año 2022 se han identificado más de 11,000 STs, según la base de datos de EnteroBase (http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/download_7_gene), de los cuales, en casos de *E. coli* multirresistentes a antibióticos, se han identificado diversos linajes pandémicos que son de preocupación en especial por su capacidad de diseminar genes de resistencia a antibióticos y con capacidad de infectar a diversos hospederos, incluidos humanos, como ST10, ST38, ST115, ST131, ST354, ST410, ST648, ST517 y ST711, los cuales están relacionados como portadores de genes de resistencia a antibióticos como el gen $bla_{CTX\text{-}M}$ y el gen *mcr*, de resistencia a betalactámicos de amplio espectro y resistencia a colistina, respectivamente. En el caso de los secuenciotipos ST48, ST90, ST155, ST167, ST224, ST349, ST457, ST648, ST707, ST744, ST774, y ST2509 están relacionados con la diseminación de genes de resistencia a carbapenémicos, como los genes $bla_{KPC\text{-}2}$ y $bla_{NDM\text{-}1}$ (Fuga *et al*., 2022).

iii. Clasificación en Filogrupos

Filogenéticamente, *E. coli* puede ser clasificado en 8 filogrupos principales: A, B1, B2, C, D, E, F, G, además de clados crípticos, que van desde el I al V (Clermont *et al.*, 2013). Estos filogrupos difieren en sus características fenotípicas y genotípicas, metabolismo, nichos ecológicos, habilidad para causar enfermedades y susceptibilidad a adquirir genes de resistencia (Tenaillon *et al*., 2013). El esquema de Clermont *et al.,* 2000, clasifica las cepas de *E. coli* en 2 grandes grupos: extraintestinales (filogrupos B2 y D) e intestinales (filogrupos B1 y A), pero existen reportes más específicos de asociación de los filogrupos con superficies, hospederos, entre otros, por ejemplo, *E. coli* del filogrupo B1 están adaptados a superficies acuosas (Berthe *et al*.,

2013). Cepas enterohemorragicas de *E. coli* son frecuentemente hallados dentro de los filogrupos B1 y E (Dallman *et al*., 2021). Miembros del filogrupo E usualmente son comensales y hallados en mamíferos (incluyendo humanos) y aves, y raramente causantes de infecciones extraintestinales en aves y mamíferos (Touchon *et al*., 2020). El análisis del genoma *core* confirma la existencia de estos filogrupos (Touchon *et al*., 2020). El filogrupo E se reconoce como monofilético y emergió entre los grupos D y A/B1 (Touchon *et al.*, 2020), mientras que el análisis de más de 10,000 genomas de *E. coli/Shigella* divide el grupo E en dos grupos o *clusters*, E1 y E2 (Abram *et al*., 2021).

2.6. Genes de resistencia en animales

La adquisición de ARGs primariamente se da a través de la recombinación genética de microbios comensales y patógenos, asociados bajo mecanismos de conjugación de genes de transferencia horizontal, por ejemplo, los plásmidos, y desarrollan una fuerte resistencia a los antibióticos, principalmente entre bacterias del mismo género y en menor medida entre bacterias del mismo filo (Brown y Wright, 2016; Munita y Arias, 2016; von Wintersdorff *et al*., 2016; Wybouw *et al*., 2016).

Estudios recientes han encontrado que en alimentos tales como carne, vegetales y frutas no solo son reservorios de ARGs y bacterias resistentes a antibióticos, sino que también actúan como mediadores para la transferencia de genes de resistencia a antibióticos y bacterias resistentes entre el medio ambiente y humanos por contacto directo o indirecto a través del consumo de alimento contaminado (Pehrsson *et al*., 2013; Penders *et al*., 2013; Rizzo *et al*., 2013; von Wintersdorff *et al*., 2014).

Los ARGs han sido encontrados en suelos no expuestos a antimicrobianos, sin embargo, la actividad humana está en incremento y existe un frecuente cambio del resistoma ambiental. En efecto, los microbiomas animales han adquirido genes a lo largo de los años de exposición a agentes antimicrobianos y metales pesados, usados como terapéuticos, metafilácticos, profilácticos y promotores del crecimiento (Cuadro 1).

Cuadro 1. ARGs detectados en ADN de fagos ambientales (Zonghui *et al*., 2021)

Tipo de droga	Genes	Origen	Localización
β - lactamasas	bla_{TEM}, *mecA*, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1,9}$	Desechos fecales de cerdos, aves de corral y bovinos.	España
	$bla_{CTX\text{-}M\text{-}25}$, $bla_{TEM\text{-}116,229}$	Planta de tratamiento de aguas residuales.	Argentina
	$bla_{CTX\text{-}M9}$, *mecA*	Aguas residuales urbanas y fluviales.	Barcelona
	$bla_{CTX\text{-}M\text{-}15,33,109,114}$, $bla_{TEM\text{-}116}$	Muestras fecales humanas.	España
	bla_{TEM}, $bla_{CTX\text{-}M}$, bla_{PSE}, $bla_{CMY\text{-}2}$	Planta de tratamiento de aguas residuales.	Washington
	$bla_{HRV\text{-}1}$, $bla_{HRVM\text{-}1}$	Aguas superficiales urbanas	Corea del Sur
	bla_{KPC}, $bla_{OXA\text{-}48\text{-}like}$, bla_{NDM}	Planta de tratamiento de aguas residuales.	Washington
	bla_{TEM}, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1,9}$, $bla_{OXA\text{-}48}$, bla_{VIM}, *mecA*	Carne picada de cerdo, ternera, pollo, jamón y mortadela.	España
	$bla_{CTX\text{-}M}$	Agua de río	China
Quinolonas	*qnrA*, *qnrS*	Muestras fecales humanas	España
	aac(6')-Iu,Is,Iy, *qnrA3*	Aguas superficiales urbanas	Corea del Sur
	aac(6')-Ib-cr, *qnrS*	Heces de pollo	China
	qnrA, *qnrS*	Carne picada de cerdo, ternera, pollo, jamón y mortadela.	España
	aac(6')-Ib-cr	Agua de río	China
Glicopéptidos	*VanY*	Aguas superficiales urbanas	Corea del Sur
Sulfanilamida	*dfrB2*	Aguas superficiales urbanas	Corea del Sur
	sul1	Agua de mar	Mediterráneo y Antártida
	sul1, *sul2*	Heces de pollo	China
	sul1	Carne picada de cerdo, ternera, pollo, jamón y mortadela.	España
Tetraciclinas	*tetW*	Agua de mar	Mediterráneo

			y Antártida
	tetM	Heces de pollo	China
Macrólidos	*ermB, ermF*	Heces de pollo	China
	ermF	Agua de río	China

2.6.1. Genes de resistencia a antimicrobianos en bacterias Gram negativas

Las bacterias Gram negativas, especialmente del grupo ESC(K)APE (*Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa* y Enterobacteriaceae) son de gran interés pues en ellos se han descrito un gran número de genes de resistencia a antibacterianos. El Cuadro 2 resume una parte del conocimiento acerca de la resistencia a antimicrobianos en los miembros de este grupo, como por ejemplo los genes de resistencia a carbapenemicos encontrados en bacterias Gram negativas de fuentes de origen animal (Al Bayssari *et al*., 2015; Fisher *et al*, 2012; Guerra *et al*., 2014, Michael *et al*., 2015, Schwarz *et al*., 2016; Wang *et al*., 2014; Webb *et al*., 2016; Zhang *et al*., 2013).

Cuadro 2. Ejemplos de genes codificantes de carbapenemasas encontrados en bacterias Gramnegativas desde animales.

Gen	Especies	Origen
bla_{IMP}	*P. aeruginosa*	Perro
bla_{NDM-1}	*A. baumannii*	Cerdo
	E. coli, S. entérica	Ganado diverso y animales silvestres
bla_{NDM-5}	*E. coli*	Aves de corral
bla_{NDM-9}	*E. coli*	Pollo
bla_{OXA-23}	*A. baumannii*	Ganado diverso y animales de compañía
	A. Iwoffi	Aves domésticas para consumo.
bla_{OXA-48}	*E. coli, K. pneumoniae*	Animales de compañía
bla_{OXA-58}	*A. baumannii*	Aves de corral
$bla_{OXA-497}$	*A. baumannii*	Ganado lechero
bla_{VIM-1}	*E. coli, S. entérica*	Ganado diverso, animales de compañía y animales silvestres.
bla_{VIM-2}	*P. aeruginosa*	Vacunos y aves de corral

2.6.2. Genes de resistencia a antimicrobianos (ARGs) en bacterias Gram positivas

Tres especies Gram positivas son consideradas como miembros del grupo ESC(K)APE, los cuales son *Clostridium difficile, Enterococcus faecium,* y *Staphylococcus aureus*. La resistencia antimicrobiana en animales, particularmente en los genes comunes dentro de las especies es detallado en la Cuadro 3 (Brenciani *et al*., 2016; Deshpande *et al*., 2015; He *et al*., 2016; Fan *et al*., 2016; Liu *et al*., 2014; López *et al*., 2012; Roberts *et al*., 2012; Shen *et al*., 2013; Spigaglia *et al*., 2016; Van Hoek *et al*., 2011; Wendlandt *et al*., 2013).

Cuadro 3. Ejemplos comunes de ARGs encontrados en *Clostridium*, *Enterococcus* y *Staphylococcus*.

Grupo de agentes antimicrobianos	Mecanismos de resistencia	Genes de resistencia	Grupo de especie
Cloranfenicol	Flujo de salida activo (Transportador MFS)	*fexA*	*Enterococcus, Staphylococcus*
MLS_B	Modificación de sitio objetivo (metilación del rRNA)	*erm (A)*	*Clostridium, Enterococcus, Staphylococcus*
		erm (B)	*Clostridium, Enterococcus, Staphylococcus*
Oxazolidinonas	Flujo de salida activo (Transportador ABC)	*optrA*	*Enterococcus, Staphylococcus*
$PhLOPS_A$	Modificación del sitio objetivo (metilación rRNA)	*cfr*	*Enterococcus, Staphylococcus*
		*cfr(*B*)*	*Clostridium, Enterococcus.*
Tetraciclina	Protección del sitio objetivo (proteína protectiva ribosomal)	*tet(*M*)*	*Clostridium, Enterococcus, Staphylococcus*
Trimetropin	Reemplazo del objetivo (Resistencia de trimetropin al Dihidrofolato reductasa)	*dfrK*	*Enterococcus, Staphylococcus.*
Glicopéptidos	Reemplazo del objetivo (modificación del precursor peptidoglucano)	*vanA*	*Enterococcus, Staphylococcus.*

2.7. Clasificación de antibióticos en base a su mecanismo de acción.

2.7.1. Antibióticos beta-lactámicos

La ampicilina es un antibiótico beta-lactámico de espectro reducido, su mecanismo de acción consiste en interferir en la formación de la pared bacteriana, específicamente en las últimas fases de la síntesis del peptidoglicano. La resistencia a beta-lactámicos se da principalmente por la presencia de enzimas llamadas betalactamasas, los cuales ocasionan una hidrólisis enzimática del enlace amida del núcleo beta-lactámico, inactivando el antibiótico. La familia de las betalactamasas se divide en 3 grupos, los cuales están subdivididos en 16 subgrupos. Actualmente se han identificado una gran cantidad de betalactamasas (aproximadamente 890) pero se siguen identificando nuevas enzimas betalactamasas. Las familias más comunes de betalactamasas identificadas en enterobacterias son: bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{OXA-1} y bla_{CARB} (Bush y Jacoby, 2009; Bush *et al*., 2015).

2.7.2. Antibióticos quinolonas

Las quinolonas actúan inhibiendo la acción de las topoisomerasas tipo II (ADN girasa y topoisomerasa IV). El blanco principal constituye la ADN girasa mientras que la topoisomerasa IV actuaría como blanco secundario en bacterias gram negativas. La enzima ADN girasa se encuentra compuesta por cuatro subunidades: dos tipo A y dos tipo B, los cuales se encuentran codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB* respectivamente, y tiene como función catalizar el superenrrollamiento negativo del ADN. En el caso de la enzima topoisomerasa IV, que constituye el blanco principal en caso de las bacterias Gram positivas, también está compuesto por cuatro subunidades, los cuales están codificadas por *parC* y *parE*, homólogas a *gyrA* y *gyrB*, respectivamente.

2.7.3. Antibióticos tetraciclinas

El mecanismo de acción de las tetraciclinas consiste en la unión a las subunidades 16S y 30S del ribosoma bacteriano, evitando la unión del aminoacil-tRNA a la posición A del ribosoma, inhibiendo así la síntesis de proteínas. Durante décadas, las tetraciclinas han venido siendo utilizadas como tratamiento contra infecciones en clínica humana y veterinaria, además de ser usado como promotor de crecimiento en animales de producción. Las bombas de flujo localizados en la membrana celular constituyen los mecanismos de resistencia más comunes siendo codificados en bacterias Gram negativas, como *E. coli*, por los genes *tetA, tetB, tetC, tetD, tetE, tetI y tetY* (Chopra y Roberts, 2001; Karami *et al*., 2006).

2.7.4. Antibiótico cloranfenicol

Este antibiótico es ampliamente utilizado en el tratamiento de infecciones humanas y animales, por ser de amplio espectro, presentando acción bactericida contra Gram positivas, Gram negativas, clamidias, micoplasmas y Rickettsias. Su mecanismo de acción consiste en evitar la elongación de la cadena peptídica, al unirse de forma reversible al centro de la peptidiltranferasa del ribosoma 70S, inhibiendo de esta forma la biosíntesis de proteínas. El mecanismo de resistencia más frecuente contra este antibiótico consiste en la inactivación enzimática por acetilación mediante enzimas cloranfenicol acetiltransferasas (CAT), siendo identificados varias de estas enzimas, los cuales se dividen en dos tipos: A y B, por sus diferencias en sus secuencias de aminoácidos. Se han descrito otros mecanismos de resistencia a cloranfenicol, como la presencia de sistemas de exportadores específicos para cloranfenicol y derivados, como florfenicol, relacionados con la presencia de genes como *cmlA* y floR (Levy *et al*., 1999; Scwarz *et al*., 2004).

2.7.5. Antibiótico trimetropin- sulfametoxazol

Las sulfonamidas han venido siendo extensamente usadas para el tratamiento de infecciones tanto en medicina humana como en medicina veterinaria, generando rápidamente una alta frecuencia de aislados con resistencia antibiótica, por lo que empezó a utilizarse en combinación con diaminopirimidinas, como la trimetroprina. Las sulfonamidas ejercen su acción inhibiendo la síntesis de la enzima dihidropteroato-sintasa, que es clave en la ruta de síntesis de ácido fólico. Por otro lado, la trimetoprina actúa inhibiendo la enzima dihidrofolato reductasa (dfr), el cual también es importante para la síntesis de ácido fólico. Los principales mecanismos de resistencia a estos antibióticos están mayormente relacionados a la presencia de genes como *sul1*, *sul2* y *sul3*, diseminados por elementos móviles como integrones codificantes de formas análogas de la enzima dihidropteroato sintasa de baja afinidad a las sulfonamidas. Con relación a la trimetroprina, múltiples genes de resistencia a este antibiótico fueron identificados, como los genes *dfr*, tales como *dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA7*, *dfrA12* y *dfrA17*, y transmitidos por elementos génicos móviles como integrones de tipo 1 y 2 (Ho *et al*., 2009; Infante *et al*., 2005; Dahmen *et al*., 2010; Balley *et al*., 2010).

2.7.6. Antibióticos polimixinas

Un antibiótico representativo de las polimixinas es la colistina, el cuál es un polipéptido cíclico, que por sus propiedades tensoactivas tiene la capacidad de alterar la permeabilidad de la pared de las bacterias gramnegativas sensibles, específicamente sobre los lipopolisacáridos. Las polimixinas son compuestos bactericidas, por la atracción electrostática ejercida entre la carga

positiva de los grupos amino y los aniones fosfato y carboxilato que componen la capa de lipopolisacáridos. Por tanto, es debido a la interacción entre los ácidos grasos y otras regiones hidrofóbicas de la colistina con los dominios hidrofóbicos de la capa de lipopolisacáridos lo que promueve modificaciones en la estructura de la pared celular, perdiendo del contenido bacteriano e ingresando el fármaco terminando en la muerte bacteriana (Landersdorfer y Nation, 2015). Los genes de resistencia a colistina a través de plásmidos identificado por Liu *et al*., 2015 en China y publicado el 2016, denominado *mcr-1*.

2.8. Base genética de resistencia antibiótica

Es definida como la capacidad de las bacterias para prevenir el efecto bacteriostático o bactericida de ciertos fármacos, que se asocia principalmente al uso extendido e indiscriminado de antibióticos llegando a ser un problema de relevancia mundial (Munita y Arias, 2016).

A continuación, se enumeran las 4 principales formas de evolución genómica de la resistencia antibiótica:

2.8.1. Resistencia natural

En este tipo de resistencia, el uso de antibióticos no está asociado con la resistencia, pero está causado por las propiedades estructurales de las bacterias (Kadhum y Hassam, 2019). Esto ocurre como resultado de la resistencia intrínseca, o microorganismos que no siguen la estructura antibiótica objetivo. Como ejemplo están las bacterias Gram- negativas y la vancomicina, debido a que no atraviesan la membrana externa, siendo estas bacterias Gram- negativo naturalmente no susceptibles a la Vancomicina (Antonoplis *et al*., 2019).

2.8.2. Resistencia adquirida

El desarrollo de esta resistencia se da debido a la alteración en las características genéticas de la bacteria, la adquieren porque estos no son afectados por los antibióticos a los fueron previamente susceptibles. La resistencia adquirida proviene principalmente de estructuras cromosomales y extracromosomales (plásmidos, transposones, etc.) (Aljanaby y Aljanaby, 2018).

Los cambios aleatorios mutacionales en el cromosoma bacteriano contribuyen a la resistencia cromosomal, estas mutaciones pueden ocurrir por ciertos factores físicos y químicos (Majeed y Aljanaby, 2019). Los cambios en la composición de las células bacterianas pueden disminuir la permeabilidad o cambios en objetivos específicos celulares, desarrollando resistencia a antibióticos de esta manera, como en el caso de estreptomicina, aminoglucósidos, eritromicina y lincomicina (Krause *et al*., 2016).

La resistencia cromosomal y extracromosomal recae en el material genético que puede ser transmitido vía plásmidos, transposones e integrones (Jabuk *et al*., 2017). Los plásmidos son secuencias de ADN que pueden replicarse independientemente del ADN cromosomal, siendo los plásmidos los responsables de la inactivación antibiótica de enzimas (Thomas y Frost, 2014; Aljanaby *et al*., 2019).

Desde una perspectiva evolucionaria, las bacterias presentan 2 estrategias genéticas adaptativas para el ataque de antibióticos, los cuales son mutaciones genéticas comúnmente asociada con el mecanismo de acción del compuesto y mediante la adquisición de ADN foráneo que codifica para determinantes de resistencia a través de la transferencia horizontal de genes (HGT).

Resistencia mutacional

Un subconjunto de células bacterianas proveniente de una población sensible desarrolla cambios mutacionales en los genes que afectan la actividad de la droga, resultando en la supervivencia celular en presencia de la molécula antimicrobiana.

Una vez que emerge un mutante resistente, el antibiótico elimina la población susceptible y predominan en muchos casos las células mutantes. Los cambios que conllevan a la resistencia antimicrobiana tienen alto costo para la homeostasis celular desarrollándose en presencia del antibiótico.

Transferencia horizontal de genes

La transferencia horizontal de ADN externo a través de la HGT es uno de los mecanismos más importantes de evolución bacteriana, y es uno de los responsables del desarrollo de resistencia antimicrobiana. La gran mayoría de los antimicrobianos usados en la práctica clínica son derivados de sustancias naturales o bacteriocinas que son producidos de forma natural por las bacterias en el medio ambiente. Por lo que también, poseen determinantes genéticos intrínsecos que les permiten degradar estas bacteriocinas de forma natural y existe evidencia sólida que sugiere que el "resistoma ambiental" es una fuente prolífica de ARGs de bacterias clínicamente relevantes.

Además, este intercambio de material genético ha sido implicado en la diseminación de la resistencia a múltiples antibióticos frecuentemente usados.

La adquisición de material genético externo se da generalmente por 3 mecanismos:

- Transformación (incorporación de ADN desnudo)
- Transducción (fago mediada)
- Conjugación ("sexo" bacteriano).

La transformación es probablemente el mecanismo más simple de HGT, pero la adquisición o incorporación natural de material genético externo es posible solo para un grupo de especies bacterianas.

En ambientes hospitalarios, la adquisición de bacterias resistentes involucra principalmente la transferencia genética por conjugación, el cual es un método muy eficiente de transferencia de genes que involucra el contacto entre una célula donadora y una célula receptora ocurriendo principalmente entre bacterias que habitan el tracto gastrointestinal de humanos bajo tratamiento antibiótico. La conjugación involucra la transferencia genética mediante elementos genéticos móviles (MGEs) como vehículos portadores de ARGs. Los MGEs más importantes involucrados en transferencia y diseminación de ARGs lo constituyen los plásmidos y transposones, los cuales son importantes en la emergencia y diseminación de la resistencia a antibióticos entre organismos de importancia clínica.

La transferencia por integrones representa uno de los mecanismos más eficientes para la transferencia y acumulación de ARGs. Estos elementos génicos son sistemas de recombinación específicos capaces de reclutar ORFs (marcos de lectura abiertos) en forma de cassettes de genes móviles. Los integrones pueden proporcionar un mecanismo simple pero bastante eficiente para adquisición de nuevos genes por parte de bacterias, junto con el equipamiento necesario para asegurar la expresión de estos genes.

Los genes con resistencia antibiótica en los cromosomas o plásmidos están entrelazados y están situados en el inicio con diferentes grupos de integración o integrones. La recombinación es muy normal en integrones (Adam *et al*., 2019).

2.8.3. Resistencia cruzada

La resistencia a antibióticos específicos por microorganismos específicos, trabajan con mecanismo idénticos o vinculados que son también resistentes a otros antibióticos. Estos son generalmente vistos cuando los antibióticos tienen estructuras en común, tales como la resistencia a la eritromicina, neomicina, kanamicina, o resistencia a cefalosporinas y penicilinas (Etebu y Arikekpar, 2016; Jahne *et al*., 2015).

Sin embargo, la resistencia cruzada a veces también se puede ver en un grupo completamente distinto de medicamentos como una resistencia cruzada que existe entre la eritromicina - lincomicina, esta resistencia puede ser de origen cromosómico o no (Ng, 2019).

2.8.4. Multidrogo resistencia y otros tipos de resistencia

Las especies resistentes a múltiples fármacos fueron inicialmente resistentes a sus antibióticos para luego desarrollar resistencia a otros más, no siendo eliminadas o reguladas por un solo medicamento, mientras que el uso inadecuado de antibióticos para el tratamiento terminó en la introducción de bacterias patógenas resistentes a múltiples fármacos. Cualquiera de los dos mecanismos puede inducir resistencia a múltiples fármacos en bacterias (Alanis, 2005; Dheda *et al*., 2017; Rello *et al*., 2016).

En primer lugar, estas bacterias adquirirán varios genes, cada uno de estos codifica resistencia específica a los medicamentos, ésta forma de resistencia generalmente existe en los plásmidos R. En segundo lugar, la forma de resistencia a múltiples fármacos también puede ocurrir por una mayor expresión génica que codifica para bombas de flujo de salida, inactivación enzimática para antibióticos, cambios en la estructura del objetivo y otros (Tóth *et al*., 2020; Salloum *et al*., 2020).

Sí las cepas bacterias no son susceptibles a 3 o más tipos antimicrobianos, son llamados bacterias multidrogo resistentes (MDR). Sí estas especies, son resistentes a todos menos a una o dos clases de antibióticos, se consideran altamente resistentes a los medicamentos, si las especies resistentes a todos los antibióticos utilizables se conocen como pan- drogo resistentes (Stanford *et al*., 2020; AL- Harmoosh *et al*., 2015).

En un estudio reciente del 2021, enfocado en evaluar la evolución genómica de resistencia antimicrobiana en *Escherichia coli*, donde analizaron muestras de heces de 3 especies animales de granja de 6 países europeos, concluyeron que existe una concordancia entre el estudio metagenómico y el secuenciamiento del genoma completo pudiendo servir en cualquier forma para la vigilancia de la resistencia antimicrobiana (RAM), desempeñando un importante papel los elementos génicos móviles (MGEs) (Leekitcharoenphon *et al*., 2021).

2.9. Mecanismos de resistencia a antibióticos

Las bacterias han desarrollado mecanismos sofisticados de resistencia a medicamentos para evitar la muerte por moléculas antimicrobianas, el cual es desarrollado ya hace millones de años con la evolución (Munita y Arias, 2016).

2.9.1. Modificaciones de la célula antimicrobiana

La producción de enzimas que inactivan fármacos mediante la adición de sustancias químicas específicas al compuesto o que destruyen moléculas en sí, haciendo que el antibiótico no pueda interactuar con él. Entre otras cosas, la mayoría de los antibióticos afectados por esas modificaciones enzimáticas ejercen su mecanismo de acción inhibiendo la síntesis de proteínas a nivel ribosómico.

Alteraciones químicas de los antibióticos

Uno de los principales mecanismos adquiridos de resistencia a antibióticos en bacterias Gram positivas y negativas es la producción de enzimas capaces de originar cambios químicos en las moléculas antibiomicrobianas (Wilson, 2014).

Destrucción de molécula antibiótica

La producción de betalactamasas por parte de ciertas bacterias constituye el principal mecanismo de resistencia a betalactámicos, estas enzimas son capaces de hidrolizar el anillo betalactámico, inactivándolos.

2.9.2. Disminuyendo la penetración y extrusión del compuesto antimicrobiano

Disminuye la permeabilidad

Diversos antibióticos usados en la práctica clínica poseen dianas bacterianas intracelulares o, en el caso de las bacterias Gramnegativas, dianas localizadas en la membrana citoplasmática (la membrana interna). Por lo que el compuesto debe atravesar la membrana citoplasmática para ejecutar su efecto antimicrobiano. Sin embargo, las bacterias han sido capaces de desarrollar mecanismos para evitar la internalización del antibiótico al espacio intracelular o periplásmico al eliminar la absorción de la molécula antimicrobiana.

Bombas de eflujo

La producción de maquinarias de complejos bacterianos capaces de expulsar una sustancia fuera de la célula también puede dar lugar a la resistencia a los antimicrobianos.

2.9.3. Cambios y/o elusión de los sitios objetivo.

Se evita la acción del antibiótico mediante la interferencia del sitio diana. . Las bacterias han podido desarrollar diversas estrategias, como la protección del objetivo (evitando que el

antibiótico alcance el sitio de unión) o modificación del sitio objetivo, resultando en una disminución de la afinidad por la molécula del antibiótico.

- Protección al sitio objetivo
- Modificación de los sitios objetivo
- Mutación del sitio objetivo
- Alteración enzimática del sitio objetivo
- Reemplazo completo o derivación del sitio objetivo.

2.9.4. Resistencia debido a adaptación global celular

A nivel mundial, las enterobacterias presentan altos niveles de resistencia a antibióticos como la ampicilina (beta-lactámico), sulfametoxazol con trimetroprina, tetraciclinas, cloranfenicol y ácido nalidíxico por lo que se debe determinar la prevalencia de los diferentes genes relacionados a nivel molecular.

2.9.5. Inactivación enzimática de antibióticos

Muchas de las bacterias sintetizan enzimas que degradan antibióticos, el mecanismo de inactivación enzimática es uno de los mecanismos de resistencia a antibióticos más importantes (Pérez-Llarena y Bou, 2016). En este grupo, las beta- lactamasas, aminoglucósidos, cloranfenicol, y las enzimas modificadas de eritromicina son los ejemplos más populares (Sharkey y O´Neill, 2019).

2.10. Genes de resistencia en producción animal

Desde la década de los 60, los antibióticos se han aplicado de forma masiva en dosis subletales como promotores de crecimiento en animales destinados a producción de alimentos (Hassan *et al*., 2018), dando lugar a concentraciones sub inhibitorias en tejidos e intestinos en los animales y en el medio ambiente (Khan *et al*., 2013, Lim *et al*., 2020). Las dosis subletales de antibióticos disminuyen la cantidad total de bacterias en el tracto gastrointestinal al reducir la competencia entre el microorganismo y el huésped por los nutrientes y favorecer la selección de bacterias resistentes a antibióticos al promover su crecimiento y también introduciendo mutaciones en ciertos genes que pueden también generar resistencia a antibióticos (Economou y Gousia, 2015).

La presencia de bacterias resistentes a antibióticos también puede incrementar la transferencia horizontal de genes que promueven esta resistencia entre las bacterias residentes del tracto gastrointestinal del individuo huésped y afectar el *quorum sensing*, como, por ejemplo, la

transferencia horizontal de genes de resistencia a azitromicina, ciprofloxacina o tigeciclina entre *Enterococcus faecalis* y *Pseudomona aeruginosa* (Zalewska *et al*., 2021).

La mayoría de ARGs se transfieren de forma horizontal, es decir mediante el intercambio de elementos génicos móviles, como plásmidos o transposones portadores de estos genes. La dinámica de transferencia depende no solo de la presencia de selección positiva, es decir, concentraciones de antibióticos en el medio ambiente, concentraciones más altas o bajas que las concentraciones mínimas inhibitorias, sino también de la estructura poblacional de la comunidad microbiana residente y la presencia de protozoarios depredadores (Cairns *et al*., 2018).

LA OMS, la OIE y la FAO han declarado de forma oficial que el uso no humano de distintos antibióticos puede tener consecuencias nocivas para la salud humana (So *et al*., 2015), y algunos países ya han declarado oficialmente la prohibición del uso de antibióticos en producción animal, pero otros países pertenecientes a Asia, África y América aún continúan con esta práctica, donde las penicilinas, tetraciclinas y sulfonamidas son los más usados, según la EMA, en el 2017 (Van Boeckel *et al*., 2015; ECDE/EFSA/EMA, 2017).

2.10.1. El uso de antibióticos en la industria del cerdo y su efecto en el resistoma fecal

La producción porcina a nivel mundial se mantiene en constante aumento en los últimos 50 años, llegando a una producción mundial de 120 millones de toneladas en el año 2018, siendo China el responsable del 45% de la producción mundial, seguido de Estados Unidos, Alemania, España y Vietnam (FAOSTAT, 2020). Según la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), el 55.5% de los antibióticos usados en producción porcina están clasificados por la OMS como importantes, muy importantes y críticamente importantes en la salud humana (OIE, 2015).

Dentro de los antibióticos considerados críticamente importantes para la medicina humana son las polimixinas. La polimixina no es un antibiótico de forma parenteral, porque es muy tóxico, sin embargo, la colistina, un tipo de polimixina, se ha utilizado ampliamente en la producción porcina como tratamiento para la colibacilosis porcina neonatal (Dowling *et al*., 2013). En humanos, la colistina representa la última opción terapéutica contra infecciones graves causadas por bacterias Gram negativas multirresistentes como *Acinetobacter baumanii, Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacteriace* (Catry *et al*., 2015).

El gen *mcr-1*, un gen de resistencia a colistina mediada por plásmidos fue identificado por primera vez en China (Liu *et al*., 2016) describiéndose también en otros países asiáticos, como Vietnam (Van Cuong *et al*., 2016). Debido al amplio uso de este antibiótico en Europa, este gen se ha detectado en muestras fecales porcinas de varios países de toda Europa (Quesada *et al*.,

2016, Guenther *et al*., 2017, Pulss *et al*., 2017). Variantes de este gen, como *mcr-2* y *mcr-3* también se han detectado en China (Yin *et al*., 2017) y *mcr-2* en Alemania (Roschanski *et al*., 2017).

El uso de otros antibióticos en cerdos, como el ceftiofur y ceftoquinoma está asociado a la propagación de la resistencia a cefalosporinas de 3ra y 4ta generación en aislados de *Salmonella* spp., siendo identificado el gen bla_{CMY}, que confiere resistencia a cefalosporinas de 1ra generación (Hanson *et al*., 2002). En otras partes de Europa, se identificaron *E. coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) asociado al uso frecuente de cefalosporinas de 3ra y 4ta generación (Andersen *et al*., 2015).

Otros genes de resistencia más frecuentemente detectados en aislados de cerdos son los que confieren resistencia a tetraciclina, un antibiótico ampliamente usado en la producción porcina (Haack y Andrews, 2020). El gen *tetM* confiere resistencia a una gran variedad de tetraciclinas y a menudo asociado a elementos génicos móviles, lo que aumenta su tasa de transferencia de una bacteria a otra. Este gen se encontró también en desechos de granjas de cerdos y este gen además de perfiles de multirresistencia similares en perros y moscas que vivían cerca a estas granjas (Koike *et al*., 2007).

Estudios realizados en Europa demuestran la identificación de más de 400 ARGs en muestras fecales de cerdos de producción intensiva, siendo que los perfiles de resistencia difieren entre países, incluso asociados a las políticas de uso de antimicrobianos de cada país. El gen *optrA*, que genera resistencia a Linezolid, oxazolidinona y anfenicoles (florfenicoles), se ha detectado en piaras con un mayor uso de anfenicoles (Munk *et al*., 2018).

En otros estudios realizados en China, Zhao *et al*. (2018), identificó un total de 146 ARGs procedentes de 7 granjas porcinas de crianza a gran escala, siendo que los genes encontrados fueron clasificados en aquellos capaces de desactivar el antibiótico (45% del total de ARGs identificados en este estudio), el 34% codificantes de bombas de flujo y el 20% de protección celular. Del total de ARGs identificados, el 20% conferían resistencia a aminoglucósidos, un 14.5 a betalactámicos de espectro reducido (*fox5*), 14% a tetraciclinas, 14% a macrólidos/lincosamidas, 8% a vancomicina, 2% a sulfonamida, 2% a cloranfenicol y 4% a otros antibióticos.

En Estados Unidos, cerdos suplementados con promotores de crecimiento típicos (clortetraciclina, sulfametazina y penicilina), se mostró una mayor abundancia y diversidad de bacterias portadoras de ARGs en el microbioma intestinal en comparación con animales criados sin antibióticos, siendo los más abundantes los que codifican las bombas de flujo de tetraciclina,

β-lactamasas de clase A, resistencia a sulfonamidas, aminoglucósido O - fosfotransferasas y dos tipos de bombas de flujo para múltiples antibióticos. Sin embargo, también se detectaron ARGs en alta frecuencia en cerdos no medicados. Es posible que su presencia refleja la resistencia a los antibióticos desarrollada por los animales de granja debido a la presión de selección ejercida por más de 50 años de tratamiento antimicrobiano (Looft *et al*., 2012).

2.11. Medidas de control, vigilancia, normas y efectos de los genes de resistencia en bacterias drogorresistentes

La vigilancia molecular se basa en la identificación de genes que codifican los mecanismos de resistencia en las bacterias que representan el futuro de la vigilancia de la resistencia antibiótica (OMS, 2001). El mejor manejo que se ha podido instaurar en los últimos años, son los programas de vigilancia, establecidos específicamente en algunos países, siendo la organización mundial de la salud (OMS) la que realizó el manual "Sistema mundial de vigilancia de la resistencia a antimicrobianos" del año 2017, que deriva en versiones más específicas, tales como el "Protocolo para el fortalecimiento de la vigilancia de la resistencia antimicrobiana basada en aislamientos en las Américas", por la organización panamericana de la salud (OPS) (OPS, 2021).

Las políticas del uso de antibióticos se han centrado en el impacto en la resistencia a antibióticos (RAM), el cual se resumió en mecanismos de introducción, selección, mantenimiento y propagación de la resistencia en las instituciones de salud (McGowan y Tenover, 1997). En los últimos años, el Plan de Acción de Salud (One Health Action Plan) contra la RAM publicado por la Comisión de la Unión Europea, tuvo a bien realizar un plan conjunto con Estonia para el desarrollo e implementación de estrategias y políticas nacionales contra la RAM, en el 2019. Aunque en el Plan de Acción de Salud el enfoque requiere una gestión colectiva del uso indebido de antimicrobianos en humanos y animales, la mayor parte de la RAM en humanos surge del uso de antibióticos humanos (Brussels: European Commission: 2017).

La vigilancia de la resistencia bacteriana se realiza principalmente mediante métodos fenotípicos (microbiología), aunque en años recientes se viene implementando el estudio de genes de resistencia por métodos moleculares, como el PCR (gen 16s o 23s) y la secuenciación Sanger (Ochoa *et al*, 2020; Handelman, 2004). La Organización Mundial de la Salud, en el año 2014, evidenció carencias en la información sobre los principales patógenos como amenazas para la salud pública, limitando así la capacidad de evaluar y monitorear las tendencias de RAM en todo el mundo (Adeyi *et al*., 2017). En el Perú, la vigilancia de resistencia se realiza *in vitro* por métodos fenotípicos, donde se determina la sensibilidad o resistencia a antibióticos (Pallecchi, 2004).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución y periodo de duración

Fueron colectadas muestras de heces procedentes de 3 granjas de producción intensiva de cerdos (Cuadro 4) ubicadas en los distritos de Chancay y Huaral (Provincia de Huaral) y Huacho (Provincia de Huaura) en el departamento de Lima, durante el periodo de Enero a Julio del año 2020. Los cerdos muestreados de cada granja fueron animales adultos aparentemente sanos, siendo elegidos los animales en etapa de engorde próximos a salir al camal.

Las heces colectadas fueron frescas debido a que se obtuvieron a partir de cerdos que se veían defecando en el momento del muestreo. Con la ayuda de una cuchara de plástico desinfectada, se tomó una cantidad aproximada de 5 a 10 gramos de heces por animal sin contacto directo con el suelo para evitar la contaminación con otras bacterias ambientales, las heces fueron colocadas en bolsas ziploc de primer uso, y fueron mantenidas en un cooler con geles refrigerantes aproximadamente a 4° C hasta llevarlos al laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, para su posterior procesamiento.

Se trabajó mezclando 2 gramos de heces de cada muestra fecal por corral con el fin de tener *pooles*, cada *pool* fue mezclado en un tubo de plástico cónico estéril de 50 ml. Finalmente, se obtuvieron 26 *pooles*, correspondientes a 6 corrales de la granja 1, 10 corrales de la granja 2 y por último 10 corrales de la granja 3 (Cuadro 4).

Cuadro 4. Granjas de producción intensiva de cerdos considerados en este estudio, muestras recolectadas por granjas y *pooles* formados.

Granja	Ubicación		Cantidad de muestras colectadas	Pooles
	Distrito	Provincia		
1	Chancay	Huaral	69	6
2	Huaral	Huaral	60	10
3	Huacho	Huaura	58	10

3.2. Metodología

3.2.1. Aislamiento de *E. coli*

De cada *pool* de muestras, se diluyó 2 gramos de heces en 10 ml de solución salina bufferada al 0.09%. Con la ayuda de un anza se tomó un inóculo de esta solución y se sembró en una placa de Agar MacConkey (Merck) y se difundió el inóculo por agotamiento. Fueron incubados a 37°C por 24 horas. Se seleccionaron 5 colonias sospechosas de *E. coli* (colonias rosadas lactosa positivas) por placa. Cada colonia sospechosa fue confirmada mediante inoculación de la colonia en agar Eosina Azul de Metileno (EMB Agar, Merck), en donde las colonias de *E. coli* se observan de color verde metálico. Así también, se inocularon en otros medios para su apoyo en la confirmación de las características bioquímicas propias de *E. coli*, usándose el agar citrato de Simmons, Agar hierro triple azúcar (TSI), Agar hierro lisina, medio lisina indol movilidad (LIM), Agar sulfuro indol movilidad (SIM), medio urea, medio rojo de metilo y Voges Proskauer.

3.2.2. Antibiograma

Cada uno de los aislados de *E. coli* fueron sometidos a pruebas de sensibilidad a antibióticos usando el método de difusión de discos de Kirby Bauer. Se usaron discos adquiridos por el laboratorio Thermo Scientific (Oxoid™ Antimicrobial Susceptibility discs). Los antibióticos analizados y los diámetros de halo para determinar sensibilidad y resistencia se muestran en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Antibióticos usados en la prueba de Kirby Bauer y diámetros de halo para determinar resistencia y sensibilidad en *Enterobacterias* según CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI, 2020).

Antibiótico	Familia	Símbolo	Concentración	Diámetro del halo de inhibición		
				S	I	R
Sulfametoxazol / trimetropin	Sulfonamidas	SXT	25 µg/disco	≥ 16	11 - 15	≤ 10
Cloranfenicol	Fenicoles	C	30 µg/disco	≥ 19	15 - 18	≤ 14
Nitrofurantoina	Nitrofurantoinas	F	300 µg/disco	≥17	13 - 16	≤ 12
Gentamicina	Aminoglucósidos	CN	10 µg/disco	≥ 15	13 - 14	≤ 12
Levofloxacina	Quinolona	LEV	5 µg/disco	≥ 17	14 - 16	≤ 13
Ciprofloxacina	Quinolona	CIP	5 µg/disco	≥ 21	16 - 20	≤ 15
Doxiciclina	Tetraciclina	DO	30 µg/disco	≥ 14	11 - 13	≤ 10
Oxitetraciclina	Tetraciclina	OT	30 µg/disco	≥ 19	15 - 18	≤ 14
Imipenem	Carbapenémico	IPM	10 µg/disco	≥ 16	14 - 15	≤ 13
Aztreonam	Monobactámicos	ATM	30 µg/disco	≥ 21	18 - 20	≤ 17
Cefepime	Cefalosporina	FEP	30 µg/disco	≥ 18	15 - 17	≤ 14
Cefotaxime	Cefalosporina	CTX	30 µg/disco	≥ 23	15 - 22	≤ 14
Ceftriaxona	Cefalosporina	CRO	30 µg/disco	≥ 21	14 - 20	≤ 13
Cefalotina	Cefalosporina	KF	30 µg/disco	≥ 18	15 - 17	≤ 14
Piperacilina	Betalactámico	PRL	100 µg/disco	≥ 19	15 - 18	≤ 14
Amoxicilina / Ac. Clavulánico	Betalactámico	AMC	20/10 µg /disco	≥ 18	14 - 17	≤ 13
Ampicilina	Betalactámico	AMP	10 µg/disco	≥ 21	14 - 20	≤ 13

S: sensible, I: intermedio, R: resistente

Los aislados confirmados como *E. coli* fueron colocados en tubos conteniendo 3 ml de caldo Luria Bertani (LB Broth, Merck) e incubados por 3 - 4 horas a 37°C o hasta que lleguen a una densidad óptica de 0.1, el cual fue medido mediante espectrofotometría a 600 nm de longitud de onda. Luego, con la ayuda de un hisopo estéril, se sumergió el hisopo en el caldo y se esparció de manera homogénea en placas de agar Mueller Hinton (Merck). Luego se colocaron los discos con la ayuda de una pinza plana, 6 discos por placa a una distancia tal que permita la medición del halo de inhibición. Se incubaron a 37°C por 18 horas. La determinación de sensibilidad y / o resistencia se realizará mediante la medición del diámetro del halo de inhibición alrededor del disco de antibiótico usando una regla milimetrada.

3.2.3. Extracción de ADN de los aislados de *E. coli*

Los aislados confirmados por pruebas bioquímicas como *E. coli* se repicaron en caldo Luria Bertani (LB Broth, Merck) e incubados a 37°C por 18 horas realizando la extracción de ADN a partir del pellet celular obtenido por centrifugación a 13,000 RPM por 5 minutos de 1 ml de caldo. Se procedió a realizar la extracción de ADN bacteriano usando el kit PureLink™ Genomic DNA Kit (Invitrogen) siguiendo las instrucciones sugeridas por el fabricante.

3.2.4. PCR para la detección del gen *mcr-1*

Todos los aislados fueron analizados por PCR para la detección del gen *mcr-1* usando los *primers* y condiciones descritas por Rebelo *et al.* (2018). Se usaron los *primers* 5'-AGTCCGTTTGTTCTTGTGGC-3' y 5'-AGATCCTTGGTCTCGGCTTG-3'. La mezcla de reacción consistió en 2 µl de PCR Buffer 10X (100 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl2), 1.6 µl de dNTPs 10mM, 0.2 µl de DreamTaq 5U/µl (Thermo Fisher Scientific) y 2 µl de DNA en un volumen final de 20 µl. Se usaron las siguientes temperaturas de reacción: 1 ciclo de denaturación inicial a 94 °C por 15 min, seguido de 25 ciclos de denaturación a 94 °C por 30 segundos, alineamiento a 58 °C por 90 segundos y una extensión de 72 °C por 60 s, con una extensión final de 72°C por 10 min.

3.2.5. Secuenciamiento genómico

3.2.5.1. Preparación de librerías y secuenciamiento

Se seleccionaron 17 aislados en base a su multirresistencia y presencia del gen *mcr-1*. El ADN extraído previamente se cuantificó usando el fluorómetro Qubit™ (Invitrogen), usando el kit Qubit dsDNA HS assay (Invitrogen) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Se usó 1 ng / µl de ADN genómico bacteriano para la preparación de librerías. Se usó el kit Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina) para la preparación de librerías, siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante. A cada librería correspondiente a cada muestra se le adicionaron índices (oligonucleótidos de secuencia conocida) que está incluido dentro del kit MiSeq Reagent Kits v2, los cuales incluyen reactivos para realizar la síntesis de cada uno de los fragmentos que componen las librerías y un cartucho para colocar las librerías dentro de un secuenciador Miseq (Illumina, San Diego, USA). Se generaron *reads* bidireccionales (senso y antisenso) de 250 bp.

3.2.5.2. Análisis bioinformático

Los *reads* totales generados se exportaron en formato fastq y la calidad de estas se evaluaron usando FastQC v0.11.9 (Andrews S., 2010). Los *reads* de baja calidad fueron removidos y la remoción de las secuencias de los índices de los *reads* fue realizado usando el programa Trimmomatic v0.39 (Bolger *et al*., 2014). Finalmente, los *reads* fueron ensamblados usando el programa SPAdes v3.14.1 (Bankevich *et al*., 2012). La anotación de los *contigs* o *scaffolds* generados por el ensamble de los *reads* fue realizado usando el programa Prokka 1.14.6 (Seemann, 2014). Todos estos programas fueron usados usando Linux como lenguaje de programación.

3.2.5.3 Análisis de las secuencias

Las secuencias fueron analizadas usando la herramienta MLST v2.19.0, para determinar el grupo clonal de cada secuencia y las relaciones genéticas entre ellas. Se usó la herramienta EzClermont v0.6.3 (Waters *et al*., 2020) para determinar el filogrupo de las secuencias. La identificación de genes de resistencia se realizó usando las bases de datos Resfinder del Centro de Epidemiología Genómica (https://www.genomicepidemiology.org) usando la herramienta ABRICATE v. 1.0.1, con los parámetros de 80% de identidad nucleotídica y 80% de cobertura mínima.

IV. RESULTADOS

Fueron obtenidos y analizados un total de 87 aislados de *E. coli* procedentes de muestras de heces de las 3 granjas de producción intensiva de cerdos, mediante antibiograma. De los 87 aislados analizados por antibiograma, fueron seleccionados 17 aislados, considerando su perfil de multirresistencia a antibióticos y la detección del gen *mcr1* por PCR para secuenciación. Las métricas de las secuencias obtenidas se detallan en el anexo 2. En el Cuadro 6 se detalla información sobre los aislados analizados por granja, los aislados secuenciados por granja, y los filogrupos y secuenciotipos MLST identificados por granja.

Cuadro 6. Resumen de aislados de *E. coli* analizados y secuenciados por granja de procedencia, así como información sobre la clasificación por filogrupos y de MLST de las secuencias obtenidas.

Granja	**Cantidad de aislados de *E. coli* analizados por antibiograma**	***mcr1* +**	**Cantidad de aislados secuenciados**	**Grupos MLST**	**Filogrupos**
C1	16	2	5	ST6704, ST1139	A
C2	36	2	7	ST29, ST48, ST345, ST10, ST6913	A, B1, U
C3	35	3	5	ST4379, ST10, ST772, ST5044	A, B1

U: *Unknown* (desconocido)

4.1. Análisis de los aislados de *E. coli* por antibiograma

Los aislados fueron analizados de acuerdo con la granja de procedencia. En resumen, los aislados de las 3 granjas mostraron gran resistencia (100%, 94.4% y 85.7% en la granja 1, 2 y 3, respectivamente) al antibiótico oxitetraciclina, seguido de cloranfenicol (92%, 81% y 34.3% en las granjas 1, 2 y 3 respectivamente) ampicilina (77.8%, 77.8% y 58.1% en las granjas 1, 2 y 3 respectivamente) y cefalotina (76.9%, 74.3% y 60% en las granjas 1, 2 y 3 respectivamente). Se observó alta susceptibilidad de los aislados a antibióticos beta lactámicos de amplio espectro como ceftriaxona (0%, 14.3% y 0% en las granjas 1, 2 y 3 respectivamente), aztreonam (0%, 5.6% y 0% en las granjas 1, 2 y 3 respectivamente), imipenem (0%, 2.8% y 0% en las granjas 1, 2 y 3 respectivamente), cefotaxime (0%, 8.3% y 2.9% en las granjas 1, 2 y 3 respectivamente) y cefepime (0%, 8.3% y 5.7% en las granjas 1, 2 y 3 respectivamente) (Figura 1, 2 y 3).

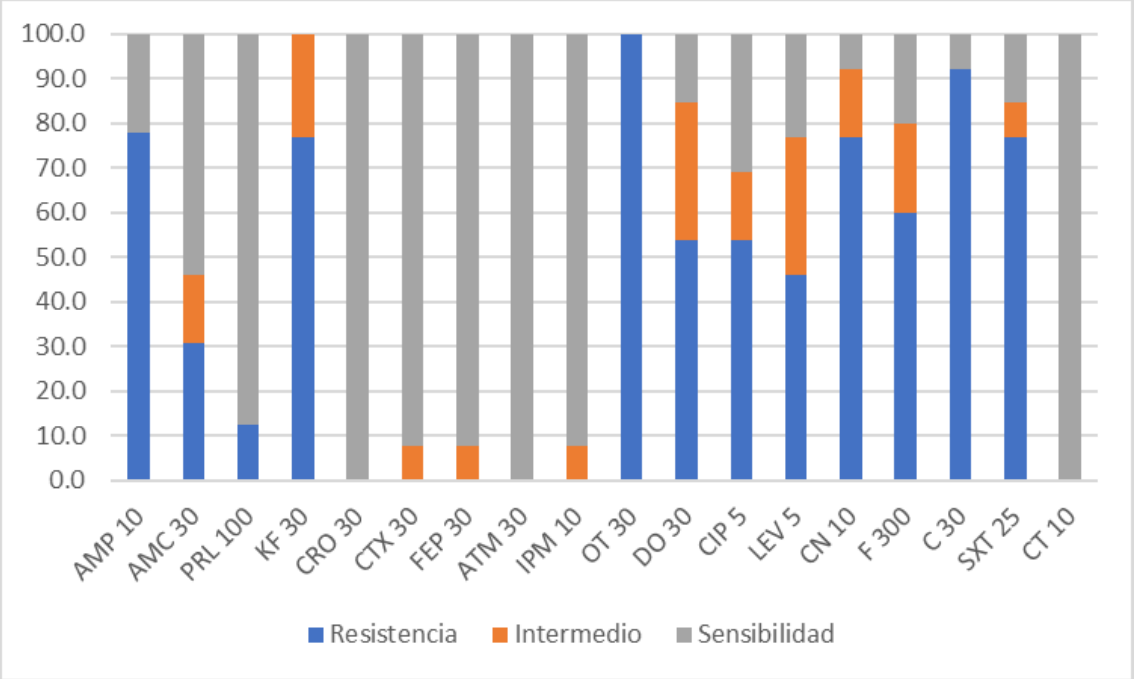


Figura 1. Perfil de resistencia/intermedio/sensibilidad a antibióticos de los aislados de *E. coli* analizados en la granja 1

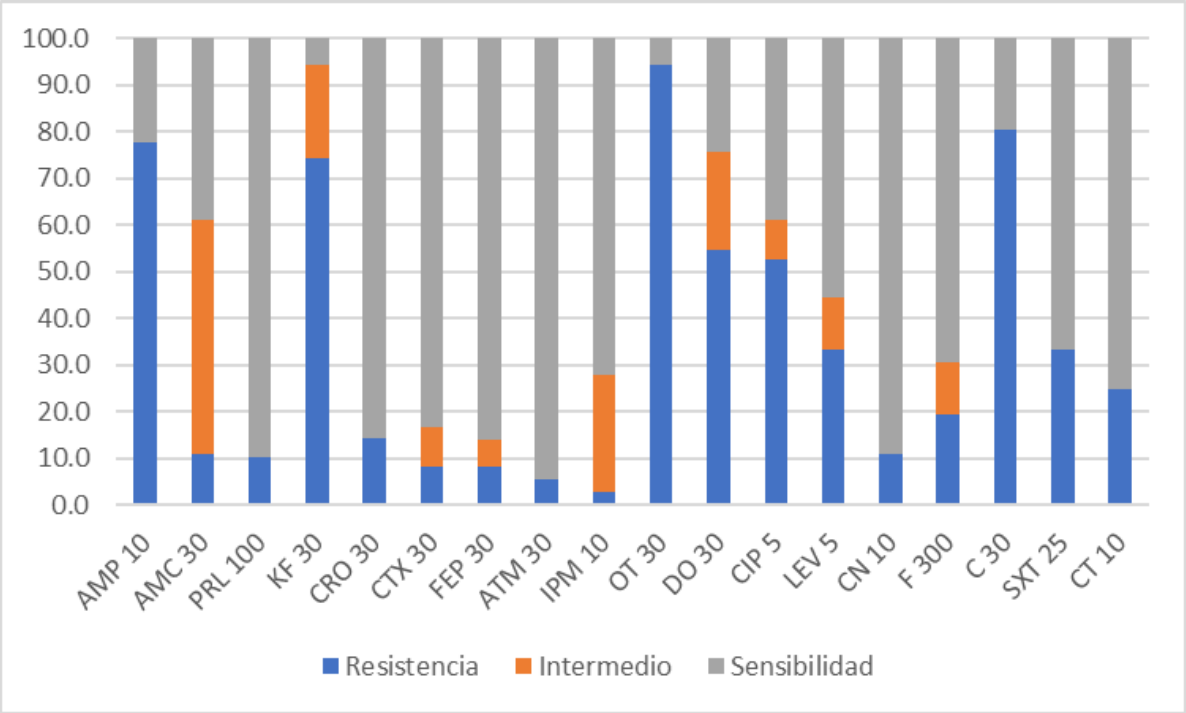


Figura 2. Perfil de resistencia/intermedio/sensibilidad a antibióticos de los aislados de *E. coli* analizados en la granja 2

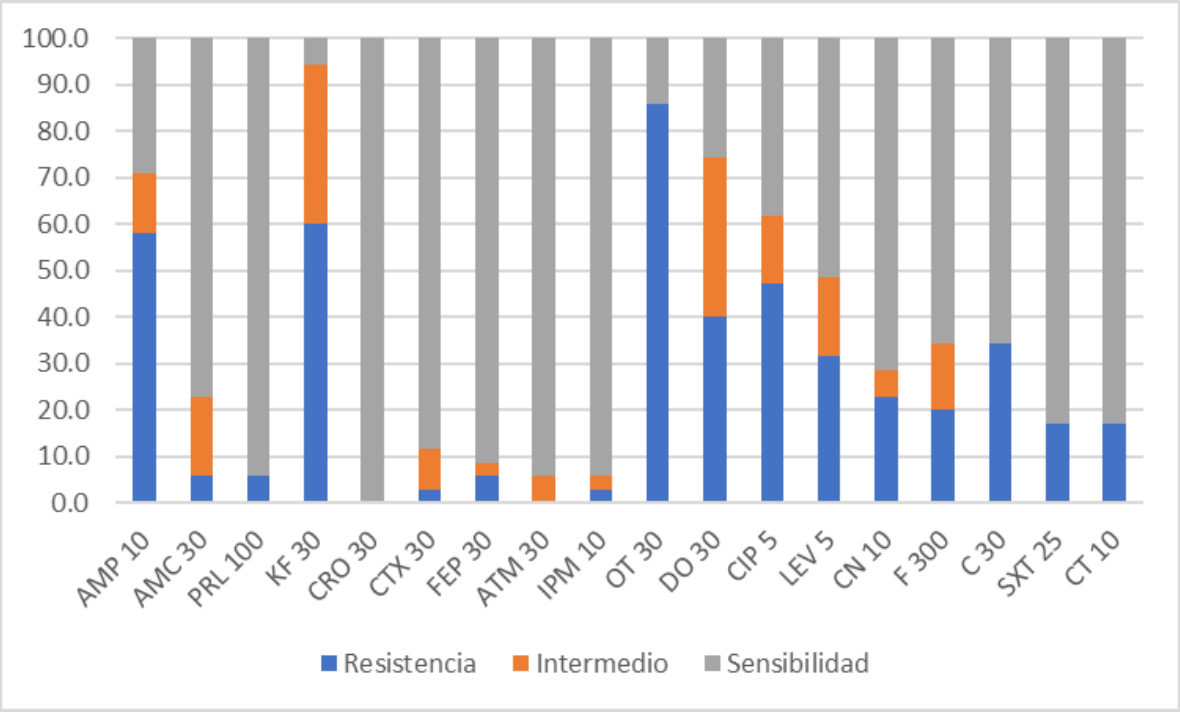


Figura 3. Perfil de resistencia/intermedio/sensibilidad a antibióticos de los aislados de *E. coli* analizados en la granja 3

4.2. Secuenciación de aislados de *E. coli* y determinación del resistoma

Fueron seleccionados aislados para secuenciamiento, de acuerdo con el perfil de resistencia y a la detección del gen *mcr1*. Finalmente, se obtuvo la secuencia de 17 aislados de *E. coli* (Cuadro 6). Los aislados de *E. coli* pertenecieron a distintos complejos clonales MLST, siendo los más comunes los grupos ST10 (3/17) y ST6704 (2/17) y mayormente pertenecientes a un mismo filogrupo A, excepto por los aislados C3P2A (filogrupo B) y C2P10C (filogrupo indeterminado). Las secuencias de los aislados tuvieron un perfil de antibiograma como se observa en el Cuadro 7, mientras que en el cuadro 8, se clasificaron los secuenciados que presentan el gen *mcr* y su correspondiente perfil de resistencia antibiótica. El análisis de los genes de resistencia demostró que todas las secuencias presentaron genes de resistencia a aminoglucósidos (17/17), macrólidos (17/17), formaldehídos (17/17), tetraciclinas (17/17), sulfonamidas (17/17), fenicoles (14/17). En menor frecuencia, fueron hallados genes contra fosfomicina (1/17), amonio cuaternario (4/17) y lincosamidas (4/17). Los genes de resistencia identificados en este estudio, ordenados por secuencias y por frecuencias de estos se describen en el Cuadro 9 y 10, respectivamente.

4.3. Códigos de acceso de las secuencias

Los genomas completos fueron depositados a la base de datos de NCBI, bajo los siguientes códigos de acceso: SAMN35667862 (C1P1A), SAMN35667863 (C1P7A), SAMN35667864 (C1P9B), SAMN35667865 (C2P2A), SAMN35667866 (C2P2C), SAMN35667867 (C2P2F), SAMN35667868 (C2P7A), SAMN35667869 (C2P10D), SAMN35667870 (C3P2C), SAMN35667871 (C3P4C), JAOYSX000000000 (C17), JAOYSW000000000 (C1P7B), JAOYSV000000000 (C2P10C), JAOYSU000000000 (C2P10E), JAOYST000000000 (C3P2A), JAOYSS000000000 (C3P2B), JAOYSR00000000 (C3P4B).

Cuadro 7. Perfil de resistencia antibiótica de los aislados de *E. coli* seleccionados para secuenciamiento

Aislados	Betalactámicos									Tetraciclinas		Fluoroquinolonas		Aminoglucósidos	Nitrofurantoinas	Fenicoles	Sulfonamidas	Polimixinas
	Penicilinas			Cefalosporinas				Monobactámicos	Carbapenémicos									
	2°		3°	1	3		4					2	3					
	AMP	AMC	PRL	KF	CRO	CTX	FEP	ATM	IPM	OT	DO	CIP	LEV	CN	F	C	SXT	CT
C17	R	R	S	R	S	I	S	S	S	R	I	R	R	I	I	R	R	S
C1P1A	R	R	S	I	S	S	S	S	S	R	I	R	R	I	I	R	R	S
C1P7A	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	I	R	R	S
C1P7B	R	S	R	R	S	S	S	S	I	R	R	R	R	R	I	R	R	S
C1P9B	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	I	R	R	S
C2P10C	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S
C2P10D	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	I	S	R	R	S	R
C2P10E	R	I	S	R	R	S	S	S	I	R	R	R	R	S	R	R	R	S
C2P2A	R	I	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	I	R	R	S
C2P2C	R	I	S	R	S	S	S	S	I	R	R	R	R	S	S	R	R	S
C2P2F	R	I	S	R	S	S	R	S	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S
C2P7A	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	R	S	S
C3P2A	R	I	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	R
C3P2B	R	S	S	I	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S
C3P2C	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S
C3P4B	R	S	S	R	S	S	R	S	S	R	I	R	I	R	S	R	S	R
C3P4C	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	I	R	R	R	R	R	S	S

Cuadro 8. Perfil de resistencia antibiótica de los aislados secuenciados y presencia del gen *mcr*.

Aislados	Betalactámicos									Tetraciclinas		Fluoroquinolonas		Aminoglucósidos	Nitrofurantoinas	Fenicoles	Sulfonamidas	Polimixinas
	Penicilinas			Cefalosporinas				Monobactámicos	Carbapenémicos									
	2°		3°	1	3		4					2	3					
	AMP	AMC	PRL	KF	CRO	CTX	FEP	ATM	IPM	OT	DO	CIP	LEV	CN	F	C	SXT	CT
C17	R	R	S	R	S	I	S	S	S	R	I	R	R	I	I	R	R	**S** *mcr*1
C1P7B	R	S	R	R	S	S	S	S	I	R	R	R	R	R	I	R	R	**S** *mcr*1
C2P10C	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	**S** *mcr*1
C2P10E	R	I	S	R	R	S	S	S	I	R	R	R	R	S	R	R	R	**S** *mcr*1
C3P2A	R	I	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	**R** ***mcr1***
C3P2B	R	S	S	I	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	**S** *mcr*1
C3P2C	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	**S** *mcr*9
C3P4B	R	S	S	R	S	S	R	S	S	R	I	R	I	R	S	R	S	**S** *mcr*1

Cuadro 9. Filogrupo, grupo MLST y genes de resistencia identificados en los aislados de *E. coli* multirresistentes procedentes de cerdos.

Aislado	Filogrupo	MLST	Gen de resistencia identificado													
			Aminoglucósido	Quinolonas	Betalactámicos	Sulfonamida	Tetraciclina	Trimetropin	Fenicoles	Macrólidos	Fosfomicina	Lincosamidas	Formaldehído	Peróxido de hidrogeno	Amonio cuaternario	Colistina
C17	A	6704	*aac(4)-IId, aadA2, ant(3)-Ia, aph(6)-Id*		*blaTEM-1B*	*sul2, sul3*	*tet(A), tet(B), tet(M)*	*dfrA12, dfrA8*	*cmlA1, floR*	*mdf(A)*			*formA*			*mcr1*
C1P1A	A	1139	*ant(3)-Ia*	*qnrB19, qnrS1*	*blaTEM-1B*	*sul(3)*	*tet(A)*	*dfrA1*	*floR*	*mdf(A), mef(B)*			*formA*	*sitABCD*		
C1P7A	A	-	*aadA2, aph(6)-Id*	*qnrB19*		*sul2*	*tet(A), tet(M)*	*dfrA12*	*floR*	*mdf(A)*			*formA*			
C1P7B	A	6704	*aac(3)-IId, aadA2, ant(3)-Ia, aph(6)-Id*	*qnrB19*	*blaTEM-1B*	*sul1, sul2, sul3*	*tet(B), tet(M)*	*dfrA12*	*cmlA1, floR*	*mdf(A)*			*formA*		*qacE*	*mcr1*
C1P9B	A	-	*aadA2, ant(3)-Ia*	*qnrS1*	*blaLAP-2, blaTEM-1B*	*sul2, sul3*	*tet(A), tet(M)*	*dfrA12*	*cmlA1, floR*	*mdf(A), mef(B)*			*formA*			
C2P10C	U	29	*aadA15, aph(3)-IIa,*	*qnrB19*	*blaCTX-M-55, blaTEM-1B*	*sul3*	*tet(A)*	*dfrA12, dfrA1*	*cmlA1, floR,*	*mdf(A)*	*fosA3*		*formA*			*mcr1*
C2P10D	A	48	*aph(3)-Ib, aph(6)-Id*	*qnrB19*			*tet(A)*			*mdf(A)*			*formA*			
C2P10E	B1	345	*aac(3)-IId, ant(3)-Ia, aph(3)-Ia,*		*blaTEM-1B*	*sul2, sul3*	*tet(A), tet(M)*	*dfrA12*	*cmlA1, floR*	*mdf(A)*		*inu(E)*	*formA*			*mcr1*
C2P2A	A	10	*aadA-2*		*blaTEM-1b*	*sul2, sul3*	*tet(A), tet(M)*	*dfrA12*	*floR, cmlA1*	*mdf(A)*			*formA*			
C2P2C	A	-	*ant(3)-la, aph(3)-la*		*blaTEM-176*	*sul3*	*tet(A)*		*florR*	*mdf(A)*			*formA*			
C2P2F	A	10	*aad-A2, ant(3)-Ia, aph(3)-Ib, aph(6)-Id*		*blaTEM-1B*	*sul3*	*tet(B)*	*dfrA12*	*cmlA1, floR*	*mdf(A)*			*formA*			
C2P7A	A	6913	*ant(3)-1a, aph(3)-la*	*qnrB19*	*blaTEM-176*	*sul2*	*tet(B)*		*floR*	*mdf(A)*			*formA*			
C3P2A	B1	4379	*aac(3)-IIa, aadA2, ant(3)-Ia, aph(3)-Ia,*	*qnrB19*	*blaTEM-1B*	*sul3*	*tet(A), tet(D)*			*mdf(A)*		*inu(E)*	*formA*			*mcr1*
C3P2B	B1	-	*aac(3)-IIa, aadA2, aph(3)-Ia,*	*qnrB19*	*blaTEM-1B*	*sul1*	*tet(A)*			*mdf(A)*		*inu(E)*	*formA*		*qacE*	*mcr1*
C3P2C	A	10	*aac(3)-IIa, aadA2, aph(3)-Ib, aph(3)-Ia,*	*qnrE1*		*sul1, sul3*	*tet(A), tet(B), tet(D)*	*dfrA12*	*floR*	*mdf(A)*			*formA*	*sitABCD*	*qacE*	*mcr-9*

C3P4B	A	772	*aac(3)-IVa, aadA2, aph(3)-Ib, aph(4)-Ia, aph(6)-Id*	*qnrB19*	*blaTEM-1A*	*sul2,*	*tet(A)*		*floR*	*mdf(A)*		*inuE)*	*formA*			*mcr1*
C3P4C	A	5044	*aac(3)-IId, ant(3)-Ia, aph(3)-Ib, aph(3)-Ia, aph(6)-Id*		*blaTEM-1B*	*sul(2)*	*tet(A)*		*floR*	*mdf(A)*		*inu(E)*	*formA*			

Cuadro 10. Diversidad de genes de resistencia a antibióticos representados en términos de cantidad de genes y frecuencia de ellos en las secuencias de *E. coli*

Familia	Antibióticos	Genes identificados	Frecuencia en *E. coli*
Aminoglucósidos (50 genes identificados)	Gentamicina	*aac(3)-IIa,*	3/50
		aac(3)-IId	3/50
		aac(3)-IVa	1/50
		aac(4)-IId	1/50
	Higromicina-B	*aph(4)-Ia*	1/50
	Kanamicina	*aph(3')-Ia*	7/50
		aph(3')-IIa	1/50
		aph(6)-Id	7/50
	Estreptomicina	*aadA2*	10/50
		aadA15	1/50
		ant(3'')-Ia	10/50
		aph(3'')-Ib	5/50
Quinolonas (12 genes identificados)	Ciprofloxacina	*qnrB19,*	9/12
		qnrE1	1/12
		qnrS1	2/12
Betalactámicos (16 genes identificados)	Ampicilina	bla_{TEM-1A},	1/16
		bla_{TEM-1B},	11/16
		$bla_{TEM-176}$	2/16
		bla_{LAP-2}	1/16
	Ceftriaxona	$bla_{CTX-M55}$	1/16
Sulfonamidas (23 genes identificados)	Sulfametoxazol	*sul1*	3/23
		sul2	9/23
		sul3	11/23
Tetraciclinas (27 genes identificados))	Tetraciclina	*tet(A)*	14/27
		tet(B)	5/27
		tet(D)	2/27
		tet(M)	6/27
Lincosamidas (5 genes identificados)	Lincomicina	*Inu(E)*	5/5
Inhibidores de la vía del folato (13 genes identificados)	Trimetropin	*dfrA1*	2/13
		dfrA8	1/13
		dfrA12	10/13
Fenicoles (21 genes identificados)	Cloranfenicol	*cmA1*	7/21
		floR	14/21
Macrólidos (19 genes identificados)	Eritromicina	*mdf(A)*	17/19
		mdf(B)	2/19
Fosfomicina	Fosfomicina	*fosA3*	1/1
Polimixinas	Colistina	*mcr1*	7/8

(8 genes identificados))		*mcr-9*	1/8
Desinfectantes (22 genes identificados)	Formaldehído	*formA*	17/17
	Peróxido de hidrógeno	*sitABCD*	2/2
	Amonio cuaternario	*qacE*	3/3

V. DISCUSIÓN

El presente estudio representa el primer esfuerzo en identificar genes de resistencia a antibióticos en granjas de producción intensiva de animales ubicados en Lima - Perú, a través del uso de la genómica como herramienta y en aislados de *E. coli* como bacteria indicadora. Esta metodología nos permitió detectar una gran variedad de genes de resistencia contra diversos antibióticos de importancia en salud clínica y animal, así como los secuenciotipos MLST y filogrupos, que permiten establecer relaciones epidemiológicas entre los aislados.

En este estudio se describe la ocurrencia de genes de resistencia en aislados de *E. coli* procedentes de cerdos mantenidos en condiciones intensivas de crianza donde probablemente al igual que en la mayoría de los establecimientos de crianza intensiva se dan protocolos de tratamiento de infecciones y promotores de crecimiento, aunque las granjas para el estudio no hayan brindado la variedad de antibióticos en uso. Esto constituye una necesidad de gran importancia, pues al desconocer el uso de antibióticos en las granjas será difícil alcanzar recomendaciones precisas y efectivas.

Dentro de los primeros resultados de este estudio, el análisis fenotípico de resistencia a antibióticos en relación a las 3 granjas evaluadas, muestran perfiles de resistencia a 4 antibióticos principalmente, entre las que están la oxitetraciclina, cloranfenicol, ampicilina y cefalotina, siendo en particular que la oxitetraciclina figuraba cercano a un 100 % de resistencia en la granja 1, 94.4% en la granja 2 y 85.7 % en la granja 3, siendo probablemente el antibiótico más usado como tratamiento o promotor de crecimiento.

Los 17 aislados secuenciados tuvieron como resultado que ocho de ellos presentaban el gen *mcr* de los cuales fueron comparados con su perfil de resistencia por antibiograma, en la tabla 8, observándose que los aislados que poseían el gen *mcr* presentaban resistencia antibiótica a

ampicilina, oxitetraciclina y ciprofloxacino, seguidas de cefalotina, doxiciclina y levofloxacino, presumiéndose que el uso de antibióticos de diverso tipo por medio de tratamiento médico, alimento, o indirectamente por el agua, vectores, entre otros, puede estar involucrado en la adquisición de la resistencia antimicrobiana.

Loa aislados fueron clasificados en 2 filogrupos, el A y B1, ambos filogrupos según el esquema de Clermont *et al.,* 2000, son intestinales correspondiendo al hallazgo en muestras fecales de cerdos de crianza intensiva aparentemente sanos, encontrándose en su mayoría (13 aislados) pertenecientes al filogrupo A, mientras que tan solo 3 pertenecen al filogrupo B1, que también ha sido asociados a superficies acuosas y cepas enterohemorrágicas (Berthe *et al*., 2013; Dallman *et al*., 2021), existiendo un total de 8 filogrupos identificados hasta la actualidad.

Los hallazgos obtenidos en este estudio principalmente indican una gran diversidad de secuenciotipos o grupos MLST en las granjas, siendo descritos 10 grupos MLST, donde ST6704 y ST10 fueron identificados en más de un aislado. *E. coli* ST6704 fue identificado principalmente en Asia, asociado a aislados de origen porcino procedente de China (Sun *et al*., 2020, Wang *et al*., 2022, Anyanwu *et al*., 2022), aunque en este estudio, los aislados ST6704 fueron positivos al gen *mcr1*, algo que no fue reportado en otros estudios en aislados del mismo grupo MLST. *E. coli* ST10 ha sido descrito en Sudamérica relacionado a aislados humanos portadores del gen *mcr1*, se ha descrito mayormente como un linaje comensal intestinal de aves y otros mamíferos (Leflon-Guibout *et al*., 2008, Diaz-Jimenez *et al*., 2020). Este secuenciotipo es considerado un linaje pandémico de alto riesgo a nivel mundial, por lo que es uno los más frecuentemente detectados en aislados de *E. coli* (Papa-Ezdra *et al*., 2020, Cheng *et al*., 2021, Fuga *et al*., 2022).

Otros secuenciotipos MLST de importancia en salud pública y salud animal, el ST1139, aislados productores de BLEE y aislados de casos de infecciones humanas del tracto urinario y de heces de aves migratorias (Mohsin *et al*., 2017, Xu y He, 2019, Wyrsch *et al*., 2022). *E. coli* ST29 fue también aislado de cerdos multirresistentes (Li *et al*., 2020), en aislados de bovinos y humanos productores de toxina shiga (Zweifel *et al*., 2013). *E. coli* ST48 es ampliamente reportado en varias partes del mundo, en animales, humanos, muestras vegetales y ambientales y asociado a genes codificantes de BLEE y *mcr1* (Liu *et al*., 2021). *E. coli* ST345 ha sido detectado en Brasil, Asia y África, en muestras fecales humanas, de cerdos, ambientales y en carne de pollo (Casella *et al*., 2017, Truong *et al*., 2021, Nowicki *et al*., 2021). *E. coli* ST4379 y ST772 fueron identificados en aislados procedentes de cerdos portadores del gen *mcr1* en China, resultado muy similar a este estudio (Cheng *et al*., 2021). Peng *et al*. (2022), también identificó estos secuenciotipos en cerdos en China. *E. coli* ST5044 también ha sido descrito en una amplia variedad de hospederos, humanos, cerdos y ambientales (Truong *et al*., 2021, Milenkov *et al*.,

2021). La mayor cantidad de secuenciotipos identificado en este estudio fueron descritos en Asia, esto es principalmente porque en estos países se viene realizando una mayor vigilancia de la diseminación de potenciales cepas diseminadoras de genes de resistencia o de otros atributos de interés en salud pública y salud animal.

Muchos de estos secuenciotipos, excepto por ST10, son reportados en baja frecuencia en diversos tipos de estudios, ya sean analizando muestras animales, humanas o ambientales, y frecuentemente asociado a la presencia de genes codificantes de BLEE y otros genes de resistencia, tal como se reporta también en este estudio. Esto apoya el hecho de que estos aislados están diseminados a nivel mundial, y pueden infectar una amplia variedad de hospederos, reforzando aún más estos estudios de vigilancia epidemiológica y amparados en herramientas como la genómica.

En relación con los genes de resistencia identificados en este estudio, fueron hallados una amplia variedad de aislados de *E. coli* de heces de cerdo de crianza intensiva. Dentro de los genes de resistencia identificados en este estudio, los genes relacionados a resistencia a betalactámicos de amplio espectro y a colistina representan los de mayor importancia en salud pública, debido a que representan las últimas opciones de tratamiento antibiótico contra bacterias multirresistentes. Cepas de *E. coli* portadores de genes codificantes de betalactamasas de espectro extendido que confieren resistencia a ceftriaxona o cefotaxime, del grupo CTX-M han sido descritos en saprofitos y patógenos zoonóticos en una amplia variedad de muestras humanas, animales, vegetales, alimentos de origen animal, medios ambientes silvestres y acuáticos (Rossolini *et al*., 2008).

En este estudio, se identificó el gen *bla* $_{CTX\text{-}M\text{-}55}$, en un aislado que demostró resistencia a cefalosporinas de 1ra, 3ra y 4ta generación. La detección de este gen viene incrementándose en frecuencia en los últimos años y relacionado a casos clínicos. En Asia, la enzima CTX-M-55 es la segunda más reportada en *Enterobacteriaceae*, principalmente en *E. coli* de origen humano y animal (Zhang *et al*., 2014), y es en este continente donde mayormente se reporta esta enzima. La importancia de este gen es que es mayormente detectado en plásmidos, lo que contribuye a su rápida diseminación (Hounmanou *et al*., 2021). El gen *bla* $_{CTX\text{-}M\text{-}55}$ fue detectado con anterioridad en Sudamérica, específicamente en enterobacterias aisladas de muestras humanas en Ecuador (Delgado *et al*., 2016). Fue reportado por primera vez en Brasil en el año 2017, a partir de hisopados cloacales en pollos aparentemente sanos, donde el gen *bla* $_{CTX\text{-}M\text{-}55}$ estuvo presente en todos los aislados detectados (Cunha *et al*., 2017), siendo también descrito en una muestra fecal humana el mismo año (Fernandes *et al*., 2018). En 2022 en el mismo país, fue hallado en 7/8 granjas de aves de producción (dos Anjos Adur *et al*., 2022). En Perú fue detectado *bla* $_{CTX\text{-}M\text{-}55}$ en

cerdos de crianza extensiva en un contexto de análisis de poblaciones de murciélagos y explotaciones animales cercanas a estos (Benavides *et al*., 2022).

Es interesante resaltar que el aislado de *E. coli bla* $_{CTX\text{-}M\text{-}55}$ + presentó también un gran repertorio de genes de resistencia contra diversos antibióticos, como aminoglucósidos, quinolonas, sulfonamidas, tetraciclinas, trimetoprim, fenicoles, macrólidos, fosfomicinas, betalactámicos de espectro reducido, desinfectantes diversos, además de ser *mcr1*+. La presencia del gen *bla* $_{CTX\text{-}M\text{-}55}$ está relacionado con la presencia de otros genes de resistencia y otros, como factores de virulencia, porque al estar codificados en plásmidos, la bacteria adquiere todo el paquete genético, siendo estas bacterias mucho más patógenas e invasivas (Yazdanpour *et al*., 2020).

Además, la fosfomicina es un antibiótico que como los betalactámicos de amplio espectro, es usado como alternativa al fracaso terapéutico usando antibióticos convencionales, siendo en humanos usado para tratamientos por infección urinaria (Johnson *et al*., 2013), siendo la detección de genes de resistencia contra la fosfomicina, de importancia en salud pública (Alrowais *et al*., 2015). La detección de un gen de resistencia como *bla* $_{CTX\text{-}M\text{-}55}$ y *fosA3*, de resistencia a fosfomicina, es motivo de preocupación, por lo que su hallazgo es motivo de reporte en estudios de investigación y vigilancia epidemiológica (Fernandes *et al*., 2018, Lupo *et al*., 2018, Menck-Costa *et al*., 2022).

Ciertos estudios hipotetizan el hecho de que el gen *bla* $_{CTX\text{-}M\text{-}55}$ llegó a esta parte del continente por intercambios comerciales con países asiáticos, donde este gen es altamente prevalente (Delgado *et al*., 2016), pero el estudio de Benavides *et al*. (2022) demuestra que este gen está presente de manera natural en animales silvestres como murciélagos, que podrían servir como reservorios de *E. coli* portadores de este gen.

Otros genes de resistencia a betalactamasas identificados en este estudio, de los tipos TEM y LAP-2, son conocidos como betalactamasas de espectro reducido, los cuales son muy comunes en bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, pudiendo estas bacterias diseminar estos genes a bacterias que infectan otros sistemas, tal es el caso de bacterias como *Acinetobacter sp.*, que adquieren resistencia a antibióticos que son usados comúnmente para tratar a estas bacterias (Poirel *et al*., 2007). Es interesante destacar que las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) derivan de las betalactamasas de espectro reducido debido a mutaciones que alteran la configuración del sitio activo de la enzima (Paterson y Bonomo *et al*., 2005).

Otro problema emergente de importancia en salud pública es la resistencia a colistina, el cual está asociado a la presencia del gen *mcr*, el cual se ha extendido en los últimos años y está

relacionado a aislados de *E. coli* procedentes de producción intensiva de animales, en especial pollos y cerdos (Quiroga *et al*., 2019) siendo que diversas evidencias indican que el origen de estos genes de resistencia es el uso masivo y extensivo por décadas de la colistina como promotor de crecimiento en animales de producción (Lentz *et al*., 2021). En este estudio, se detectó el gen *mcr* en 8 (7 *mcr1* y 1 *mcr-9*) de 87 aislados analizados (9.2%) procedentes de 3 granjas. A pesar de que esta proporción puede parecer baja, se obtuvieron aislados de *E. coli mcr* + en las 3 granjas analizadas. Otros estudios realizados, como en cerdos de producción intensiva procedentes de China, detectó el gen *mcr1* en el 27% de los aislados de *E. coli* procedentes de 6 granjas (Cheng *et al*., 2021). Otros reportes en el mismo país asiatico relatan una alta frecuencia de detección de este gen (Wang *et al*., 2016, Li *et al*., 2018). Se ha detectado este gen en aislados de diversas fuentes, principalmente humanas, en Sudamérica, aunque el reporte en fuentes animales aún es escaso, siendo este estudio uno de los primeros en reportar este gen en producción animal (Valiakos y Kapna, 2021, Lentz *et al*., 2021).

El gen *mcr9* hallado en este estudio, ha sido reportado por primera vez en un artículo en cerdos de Italia por Guarneri *et al.,* 2023, donde mencionan que dicha granja no trataba con el antibiótico colistina. En este estudio, el aislado presentaba el gen *mcr9* pero era sensible a la colistina y tenía un perfil de resistencia a otros 10 antibióticos, posiblemente la no expresión de resistencia a colistina tenga bases genéticas que deban seguir en estudio.

Los aislados secuenciados que presentaban el gen *mcr* (tanto el *mcr1* y *mcr9*) tenían a su vez un perfil de resistencia antibiótico amplio (cuadro 8), desde 6 hasta 13 antibióticos para este estudio, pero de la misma manera todos los aislados, a excepción de un aislado (C3P2A), fueron sensibles a la colistina, pudiendo inferirse que mayormente la expresión de resistencia del gen mcr1 y 9 se da por diversas causas que tendrán que investigarse pero una de las posibilidades podría ser que el uso de múltiples antimicrobianos permiten que los microorganismos tengan un selección de genes de resistencia o repertorio de genes que a través del tiempo se puedan expresar.

En tanto, en estudios previos no se mencionan brotes relacionados con microorganismos portadores del *mcr1* en particular, pero su diseminación a través de plásmidos pone aún más en alerta el hecho de que ya ha sido hallado en diversos continentes y particularmente la presencia del secuenciotipo ST10 de *E. coli* como clon pandémico, o asociado a cepas de mayor virulencia, teniendo en cuenta el riesgo probable que implique en la salud a nivel global (OPS, 2016). Por la posibilidad que en algún momento se dé una situación descrita de tipo global, en la que exista resistencia a la colistina, siendo esta la última opción terapéutica, probablemente se den mayores índices de mortalidad y morbilidad a través de los años (Catry *et al*., 2015; Medina *et al.,* 2017; OPS, 2022).

La importancia de detección de este gen *mcr* capaz de ocasionar resistencia a colistina radica en el hecho de que este antibiótico es la última línea de tratamiento cuando todas las alternativas terapéuticas han fallado, siendo llamados a las bacterias resistentes a colistina, como resistente a todos los antibióticos (Andrade *et al*., 2020). Es necesario resaltar que en el año 2016 la OPS, circuló una alerta epidemiológica donde entre otras cosas se recomendaba que los Estados Miembros implementen y fortalezcan la vigilancia e investigación epidemiológica para la detección de bacterias portadoras de resistencia a colistina mediada por plásmidos con el gen *mcr1*, con el fin de implementar medidas oportunas para la prevención y control.

En el año 2019, nuestro país tuvo parte en las medidas preventivas para enfrentar la resistencia antimicrobiana a colistina, prohibiendo la importación, comercialización, fabricación o elaboración de productos veterinarios que contengan ese principio activo, ejecutado por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA, 2019), medida que entró en vigencia en abril del 2020. Mientras que este estudio fue realizado en el año 2020, donde se hallaron genes de resistencia a colistina en el 9.2% de los aislados de *E. coli*, y posiblemente sea necesario realizar nuevos estudios a fin de conocer el estado actual de la presencia de este tipo de genes de resistencia y nos permita conocer el avance de la prohibición y la ejecución de las medidas pertinentes por parte de los productores sobre las medidas recientes en aquel momento.

Además de destacar los genes de resistencia que representan un riesgo a la salud pública y son de interés a la comunidad científica, es importante considerar aquellos genes que confieren resistencia a antibióticos que son de uso común en hospitales en nuestro país, tales como los genes de resistencia a sulfonamidas (*sul1*, *sul2* y *sul3*) siendo el más ampliamente distribuido el *sul1,* seguida del *sul2* identificado principalmente en países de Europa, y más recientemente el *sul3* hallado en animales y alimentos (Enne, 2001).

Un aislado en particular denominado C2P10C, presentó un perfil de resistencia a diversos tipos de antibióticos evaluados por antibiograma, y a través del secuenciamiento del genoma completo se observó que también contaba con la presencia de genes de relevancia en salud pública como el gen de resistencia antibiótica *mcr1*, *bla* $_{CTX\text{-}M\text{-}55}$, *fosA3*, además de genes de resistencia a antibióticos *aadA15, aph(3)-IIa*, *qnrB19*, *blaTEM-1B, sul3, tet(A)*, *dfrA12*, *dfrA1*, *cmlA1, floR, mdf(A).* El aislado C2P10C proviene de la granja 2 ubicada en la provincia de Huaral, del cual no se supo los protocolos de tratamiento antibiótico ni el tipo de promotores de crecimiento involucrados en sus programas de engorde, por lo cual se presume que la variedad de genes de resistencia encontrados puede provenir del agua, vectores, alimento, entre otros. Las otras granjas tampoco dieron sus planes de tratamiento antibiótico ni los promotores de crecimiento.

El estudio de investigación actual provee información importante sobre la presencia de genes de resistencia a antibióticos en restos fecales de animales de producción, que promuevan a próximos análisis donde tomen en cuenta más agentes (suelo, agua, vectores, humano, entre otros), involucrados en la presentación de ese tipo de genes, contribuyendo en estudios epidemiológicos, prevalencias, frecuencias, entre otros, aportando en la salud pública en nuestro país y evitando una propagación exponencial de genes de resistencia a antibióticos, o desarrollando nuevos antibióticos capaces de combatir enfermedades infecciosas que conlleven a la morbilidad y mortalidad proyectada a gran escala alrededor del 2050 (Pehrsson *et al*., 2013; Rizzo *et al*., 2013; von Wintersdorff *et al*., 2014; OPS 2022).

Existe un listado de antimicrobianos de importancia crítica (CIA) para la salud humana de la OMS, basado en el uso de los antimicrobianos en animales destinados al consumo humano generándose bacterias resistentes, siendo los antibióticos de máxima prioridad los de cefalosporinas de tercera, cuarta y quinta generación, glicopéptidos, macrólidos, polimixinas y quinolonas; y de alta prioridad aminoglucósidos, carbapenémicos monobactámicos, entre otros. Los genes de resistencia a antimicrobianos hallados en este estudio, al menos en un aislado donde se observan 2 de los más importantes, están clasificados como de máxima prioridad, probablemente relacionándose a que en un futuro no muy lejano sean insuficientes las opciones de tratamiento a diversas infecciones (WHO, 2019a).

Según un estudio realizado por Cuadros *et al*. (2019), en pacientes hospitalizados en el Hospital Cayetano Heredia durante el mes de enero del año 2019, se pudo observar que los antibióticos más usados, en el orden de mayor uso a menor uso, fueron cefalosporinas de 3ra generación (ceftriaxona), carbapenémicos (meropenem), aminoglucósidos (gentamicina y amikacina), lincosamidas (clindamicina), glicopéptidos (vancomicina), cefalosporinas de 1ra generación (cefazolina), sulfonamidas (sulfametoxazol/trimetoprim), betalactámicos (oxacilina y ampicilina), betalactámicos con inhibidores de betalactamasas (Piperacilina/Tazobactam), fenicoles (cloranfenicol) fluoroquinolona (ciprofloxacina), polimixinas (colistina), cefalosporinas de 2da generación (cefuroxima), fosfonatos (fosfomicina), cefalosporinas de 4ta generación (cefepime), macrólido (azitromicina) y rifamicinas (rifampicina). Este estudio demostró la circulación del gen $bla_{CTX\text{-}M\text{-}55}$, que confiere resistencia a cefalosporinas, un antibiótico de primera elección en pacientes hospitalizados, una gran diversidad de genes de resistencia a aminoglucósidos, contra tetraciclinas, sulfonamidas, macrólidos y quinolonas, los cuales se correlacionan con la resistencia fenotípica.

Finalmente, la identificación de estos genes en aislados de *E. coli* procedentes de materia fecal de cerdos de producción intensiva representa un llamado de alerta a intensificar la vigilancia y

disponer medidas que eviten la diseminación de bacterias que portan estos genes que confieren resistencia a antibióticos de elección en medicina humana, y tal como menciona la OPS en un comunicado, se estima que para el año 2050 el número de muertes por enfermedades ocasionadas por bacterias multirresistentes podría llegar a 10 millones a nivel mundial, es de preocupación desde ya hace unos años (OPS, 2022).

VI. CONCLUSIONES

1. La información generada resulta de vital importancia como evidencia de la diseminación de genes de gran importancia en salud pública, debiéndose tomar medidas que eviten esta dispersión de bacterias portadoras de estos genes a ambientes urbanos.
2. Los aislados de *E. coli* de cerdos de producción intensiva presentaron resistencia mayormente a antibióticos de la familia de las tetraciclinas, betalactámicos (ampicilina) y cefalosporinas de 1ra generación (cefalotina).
3. La mayor frecuencia de genes de resistencia a antibióticos presentes en los genomas de *E. coli* correspondió a aminoglucósidos, tetraciclinas, macrólidos y formaldehído (17/17 genomas), sulfonamidas (16/17 genomas), fenicoles y betalactámicos (14/17 genomas) y quinolonas (11/17 genomas).
4. La mayor cantidad y diversidad de genes de resistencia fueron aquellos relacionados con resistencia a aminoglucósidos, seguido de tetraciclinas y sulfonamidas.
5. Se logró detectar los genes *mcr1* y *mcr-9*, asociado con resistencia al antibiótico colistina.
6. Se identificó el gen $bla_{CTX\text{-}M\text{-}55}$, el cual confiere resistencia a cefalosporinas de 3ra generación (ceftriaxona).

VII. BIBLIOGRAFÌA

1. ***Aanensen DM, Spratt BG. 2005.*** The multilocus sequence typing network: mlst.net. Nucleic Acids Res. 33: W728-W733. doi: 10.1093/nar/gki415.
2. ***Aarestrup FM. 1995.*** Occurrence of glycopeptide resistance among *Enterococcus faecium* isolates from conventional and ecological farms. Microbial Drug Resistance 1(3):255-7. doi: 10.1089/mdr.1995.1.255.
3. ***Abram K, Udaondo Z, Bleker C, Wanchai V, Wassenaar TM, Robeson MS 2nd, Ussery DW. 2021.*** Mash-based analyses of *Escherichia coli* genomes reveal 14 distinct phylogroups. Commun Biol. 4(1):117. doi: 10.1038/s42003-020-01626-5.
4. ***Adam RW, Al-Labban HMY, Aljanaby AAJ, Abbas NA. 2019.*** Synthesis, characterization and antibacterial activity of some new of novel 1,2,3- triazole-chalcone derivatives from N-acetyl- 5H-dibenzo [B,F] azepine-5-carboxamide. Nano Biomed. Eng 11 (2), 99-110.
5. ***Agga GE, Arthur TM, Durso LM, Harhay DM, Schmidt JW. 2015.*** Antimicrobial-resistant bacterial populations and antimicrobial resistance genes obtained from environments impacted by livestock and municipal waste. PLoS ONE 10, e0132586.
6. ***Al Bayssari C, Dabboussi F, Hamze M, Rolain JM. 2015.*** Emergence of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in livestock animals in Lebanon. J Antimicrob Chemother 70, 950–951.
7. ***Alanis AJ. 2005.*** Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? Arch Med Res 36(6), 697-705. doi: 10.1016/j.arcmed.2005.06.009
8. ***AL-Harmoosh RA. Jarallah, EM. 2015.*** First Detection of the blaNDM-1 and blaNDM-2 Genes in a Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* in Hillah Hospitals-Iraq. Int J Adv Res 3(10): 1407 -1416.
9. ***Aljanaby AA, Witwit IN, Mubark HM, Al-Labban HMY. 2019.*** Synthesis and characterization of new imidazole azo ligand with some of transition metal ions, and their

biological effect on two pathogenic bacteria of burn patients. Int J Res Pharm Sci 10 (3), 1847-1856.

10. ***Aljanaby AAJ, Aljanaby IAJ. 2018.*** Prevalence of aerobic pathogenic bacteria isolated from patients with burn infection and their antimicrobial susceptibility patterns in Al-Najaf City, Iraq-a three-year cross-sectional study. F1000Research 7(1157), 1157.
11. ***Aljanaby AAJ, Adam RW, Al-Labban HMY, Kadhim IN. 2019***. Synthesis, characterization, and antibacterial activity of some new pyrimidine derivatives from chalcone derivatives. Drug Invention Today 11 (7), 1732-1739.
12. ***Allen HK. 2014.*** Antibiotic resistance gene discovery in food-producing animals. Curr. Opin. Microbiol 19, 25–29.
13. ***Allen JP, Snitkin E, Pincus NB, Hauser AR. 2021.*** Forest and trees: exploring bacterial virulence with genome-wide association studies and machine learning. Trends Microbiol.; Jan 14:S0966-842X(20)30317-6. doi: 10.1016/j. tim.2020.12.002.
14. ***Alrowais H, McElheny CL, Spychala CN, Sastry S, Guo Q, Butt AA, Doi Y. 2015***. Fosfomycin Resistance in *Escherichia coli*, Pennsylvania, USA. Emerg Infect Dis (11):2045-7. doi: 10.3201/eid2111.150750.
15. ***Ambardar S., Gupta R., Trakroo D., Lal R., Vakhlu J. 2016.*** High throughput sequencing: an overview of sequencing chemistry Indian J Microbiol, 56 (4), pp. 394-404
16. ***Andersen VD, Jensen VF, Vigre H, Andreasen M, Agersø Y. 2015.*** The use of third and fourth generation cephalosporins affects the occurrence of extended-spectrum cephalosporinase-producing *Escherichia coli* in Danish pig herds. Vet J 204(3):345-50. doi: 10.1016/j.tvjl.2015.03.014.
17. ***Antonoplis A, Zang X, Wegner T, Wender PA, Cegelski L. 2019.*** Vancomycin arginine conjugate inhibits growth of carbapenem-resistant *E. coli* and targets cell-wall synthesis. ACS Chem Biol 14(9), 2065-2070.
18. ***Anyanwu MU, Nwobi OC, Okpala COR, Ezeonu IM. 2022.*** Mobile Tigecycline Resistance: An Emerging Health Catastrophe Requiring Urgent One Health Global Intervention. Front Microbiol 13:808744. doi: 10.3389/fmicb.2022.808744.
19. ***Arney, K. 2021.*** DNA sequencing: the next generation. https://geneticsunzipped.com/transcripts/2021/9/23/next-generation-sequencing.
20. ***Auchtung, T.A., Takacs-Vesbach, C.D. & Cavanaugh, C.M. 2006.*** 16S rRNA Phylogenetic Investigation of the Candidate Division "Korarchaeota". Applied and environmental microbiology 72(7), 5077-5082.

21. ***Bailey JK, Pinyon JL, Anantham S, Hall RM. 2010.*** Commensal *Escherichia coli* of healthy humans: a reservoir for antibiotic resistance determinants. J Med Microbiol 59:1331-9.
22. ***Barbosa TM, Levy SB. 2000.*** The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. Drug Resist Updates 3, 303–311. doi: 10.1054/ drup.2000.0167.
23. ***Bates EM, Jordens JZ, Griffits DT. 1994.*** Farm animals as a putative reservoir for vancomycin resistant enterococcal infections in man. J Antimicrob Chemother 34: 507-516.
24. ***Benavides JA, Godreuil S, Opazo-Capurro A, Mahamat OO, Falcon N, Oravcova K, Streicker DG, Shiva C. 2022.*** Long-term maintenance of multidrug-resistant *Escherichia coli* carried by vampire bats and shared with livestock in Peru. Sci Total Environ 810:152045. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.152045.
25. ***Beneduce L, Fiocco D, Spano G. 2007.*** Development of PCR-based molecular tools for the detection of emerging food- ad water-borne pathogenic bacteria . Badajoz: Formatex.
26. ***Berthe T, Ratajczak M, Clermont O, Denamur E, Petit F. 2013.*** Evidence for coexistence of distinct Escherichia coli populations in various aquatic environments and their survival in estuary water. Appl Environ Microbiol. 79(15):4684-93. doi: 10.1128/AEM.00698-13.
27. ***Blanc DS. 2004.*** The use of molecular typing for epidemiological surveillance and investigation of endemic nosocomial infections. Infect Genet Evol. 2004;4:193-7.
28. ***Bradley P, Gordon NC, Walker TM, Dunn L, Heys S, Huang B, et al. 2015.*** Rapid antibiotic-resistance predictions from genome sequence data for Staphylococcus aureus and Mycobacterium tuberculosis. Nat Commun. 6:10063. doi: 10.1038/ncomms10063.
29. ***Brenciani A, Morroni G, Vincenzi C, Manso E, Mingoia M, Giovanetti E, Varaldo PE. 2016.*** Detection in Italy of two clinical *Enterococcus faecium* isolates carrying both the oxazolidinone and phenicol resistance gene *optrA* and a silent multiresistance gene *cfr*. J Antimicrob Chemother 71, 1118–1119.
30. ***Brown ED, Wright GD. 2016.*** Antibacterial drug discovery in the resistance era. Nature 529, 336–343. doi: 10.1038/nature17042.
31. ***Bush K, Jacoby GA. 2009.*** Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 54(3):969-76.
32. ***Bush K, Palzkill T, Jacoby G. 2015.*** ß-lactamase classification and amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-Spectrum and inhibitor resistant enzymes: Lahey Clinic. [Internet], [08 diciembre 2022]. Disponible en: https://www.lahey.org/Studies/
33. ***Cairns J, Ruokolainen L, Hultman J, Tamminen M, Virta M, Hiltunen T. 2018.*** Ecology determines how low antibiotic concentration impacts community composition and horizontal transfer of resistance genes. Commun Biol 1:35. doi: 10.1038/s42003-018-0041-7.

34. ***Calvo J, Martínez-Martínez L. 2009.*** Mecanismo de acción de los antimicrobianos. Enferm Infecc Microbiol Clin 27(1):44–52.
35. ***Cars O, Hogberg LD, Murray M, Nordberg O, Sivaraman S, Lundborg CS, So AD, Tomson G, 2008.*** Meeting the challenge of antibiotic resistance. BMJ 337: a1438.
36. ***Casella T, Cerdeira LT, Fernandes MR, Souza TA, Haenni M, Madec JY, Lincopan N, Nogueira MCL. 2017.*** Draft genome sequence of a CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST345 from commercial chicken meat in Brazil. J Glob Antimicrob Resist 9:124-125. doi: 10.1016/j.jgar.2017.04.002.
37. ***Catry B, Cavaleri M, Baptiste K, Grave K, Grein K, Holm A, Jukes H, Liebana E, Lopez Navas A, Mackay D, Magiorakos AP, Moreno Romo MA, Moulin G, Muñoz Madero C, Matias Ferreira Pomba MC, Powell M, Pyörälä S, Rantala M, Ružauskas M, Sanders P, Teale C, Threlfall EJ, Törneke K, van Duijkeren E, Torren J. 2015.*** Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. Int J Antimicrob Agents 46(3):297-306. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.06.005.
38. **Chan M, Maiden M, Spratt B. 2001.** Database-driven multi locus sequence typing (MLST) of bacterial pathogens. Bioinformatics, 17 (2001), pp. 1077-1083
39. ***Chen B, Yuan K, Chen X, Yang Y, Zhang T, Wang Y, Luan T, Zou S, Li X. 2016.*** Metagenomic analysis revealing antibiotic resistance genes (ARGs) and their genetic compartments in the Tibetan environment. Environ Sci Technol 50: 6670–6679.
40. ***Chen Y, Ye W, Zhang Y, Xu Y. 2015.*** High speed BLASTN: an accelerated MegaBLAST search tool. Nucleic Acids Res. 43:7762-68. doi: 10.1093/nar/gkv784.
41. ***Cheng P, Yang Y, Cao S, Liu H, Li X, Sun J, Li F, Ishfaq M, Zhang X. 2021.*** Prevalence and Characteristic of Swine-Origin *mcr1*-Positive *Escherichia coli* in Northeastern China. Front Microbiol 12:712707. doi: 10.3389/fmicb.2021.712707.
42. ***Chiu CY, Miller SA. 2019.*** Clinical Metagenomics. Nat Rev Genet 20: 341–355.
43. ***Choffnes ER, Relman DA, Mack A. 2010.*** Antibiotic Resistance: Implications for Global Health and Novel Intervention Strategies. Washington DC: National Academies Press.
44. ***Chopra I, Roberts M. 2001.*** Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol Mol Biol Rev. 65:232-260.
45. ***Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. 2012.*** The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. Cell 148:1258–1270. 10.1016/j.cell.2012.01.035
46. ***CLSI. 2020.*** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 30th Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute Supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA.

47. ***Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. 2013.*** The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. Environ Microbiol Rep. 5(1):58-65. doi: 10.1111/1758-2229.12019.
48. ***Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. 2000.*** Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group. Environ Microbiol, 13, pp. 2468-2477 http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02519.x | Medline
49. ***Cunha MP, Lincopan N, Cerdeira L, Esposito F, Dropa M, Franco LS, Moreno AM, Knöbl T. 2017.*** Coexistence of CTX-M-2, CTX-M-55, CMY-2, FosA3, and QnrB19 in Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* from Poultry in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 24;61(4): e02474-16. doi: 10.1128/AAC.02474-16.
50. ***Dahmen S, Mansour W, Boujaafar N, Arlet G, Bouallegue O. 2010.*** Distribution of cotrimoxazole resistance genes associated with class 1 integrons in clinical isolates of Enterobacteriaceae in a university hospital in Tunisia. Microb Drug Resist 16:43-7.
51. ***Dallman TJ, Greig DR, Gharbia SE, Jenkins C. 2021.*** Phylogenetic structure of Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7 from sub-lineage to SNPs. Microb Genom. 7(3):mgen000544. doi: 10.1099/mgen.0.000544.
52. ***Danish Agriculture and Food Council. 2018***. Danish pig meat industry. [Internet] [02 diciembre 2022]. Disponible en: https://agricultureandfood.dk/danish-agriculture-and-food/danish-pig-meat-industry.
53. ***De Pedro MA, Young KD, Höltje JV, Schwarz H. 2003.*** Branching of *Escherichia coli* cells arises from multiple sites of inert peptidoglycan. J Bacteriol 185: 1147 – 1152.
54. ***Delgado DY, Barrigas ZP, Astutillo SG, Jaramillo AP, Ausili A. 2016.*** Detection and molecular characterization of β-lactamase genes in clinical isolates of Gram-negative bacteria in Southern Ecuador. Braz J Infect Dis 20(6):627-630. doi: 10.1016/j.bjid.2016.07.001.
55. ***Deshpande LM, Ashcraft DS, Kahn HP, Pankey G, Jones RN, Farrell DJ, Mendes RE. 2015.*** Detection of a new *cfr*-like gene, *cfr(B),* in *Enterococcus faecium* isolates recovered from human specimens in the United States as part of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Antimicrob. Agents Chemother 59: 6256–6261.
56. ***Dheda K, Gumbo T, Maartens G, Dooley KE, McNerney R, Murray M, Furin J, Nardell EA, London L, Lessem E, Theron G, van Helden P, Niemann S, Merker M, Dowdy D, Van Rie A, Siu GK, Pasipanodya JG, Rodrigues C, Clark TG, Sirgel FA, Esmail A, Lin HH, Atre SR, Schaaf HS, Chang KC, Lange C, Nahid P, Udwadia ZF, Horsburgh CR Jr, Churchyard GJ, Menzies D, Hesseling AC, Nuermberger E, McIlleron H, Fennelly KP, Goemaere E, Jaramillo E, Low M, Jara CM, Padayatchi N, Warren RM. 2017.*** The

epidemiology, pathogenesis, transmission, diagnosis, and management of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and incurable tuberculosis. Lancet Respir Med 15: S2213-2600(17)30079-6. doi: 10.1016/S2213-2600(17)30079-6.

57. ***Diarrassouba F, Diarra MS, Bach S, Delaquis P, Pritchard J, Topp E, Skura BJ. 2007.*** Antibiotic resistance and virulence genes in commensal *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from commercial broiler chicken farms. J Food Prot. 70(6):1316-27. doi: 10.4315/0362-028x-70.6.1316.
58. ***Díaz-Jiménez D, García-Meniño I, Herrera A, García V, López-Beceiro AM, Alonso MP, Blanco J, Mora A. 2020.*** Genomic Characterization of *Escherichia coli* Isolates Belonging to a New Hybrid aEPEC/ExPEC Pathotype O153:H10-A-ST10 eae-beta1 Occurred in Meat, Poultry, Wildlife and Human Diarrheagenic Samples. Antibiotics (Basel). 9(4):192. doi: 10.3390/antibiotics9040192.
59. ***Doron S, Gorbach SL. 2008.*** Bacterial Infections: Overview. Elsevier Inc. 273- 274.
60. ***Dowling PM. 2013.*** Peptide Antibiotics: Polymyxins, Glycopeptides, Bacitracin, and Fosfomycin. En: Giguère S, Prescott JF, Dowling PM, eds. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. 5ta Edición. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. p 189 – 198
61. ***Economou V, Gousia P. 2015.*** Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. Infect Drug Resist 8:49-61. doi: 10.2147/IDR.S55778.
62. **Enne V, Livermore D, Stephens P, Hall L. 2001**. Persistence of sulfonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction. Lancet 357**:**1325-1328.
63. ***Escalante, A.E. 2007.*** Ecología Molecular. eds. Eguiarte, L.E., Souza, V. & Aguirre, X. (INE, SEMARNAT, CONABIO, UNAM, MÈxico, D.F., 2007), pp. 393.
64. ***Ellington MJ, Ekelund O, Aarestrup FM, Canton R, Doumith M, Giske C, et al. 2017.*** The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee. Clin Microbiol Infect. 23:2-22. doi: 10.1016/j.cmi.2016.11.012.
65. ***Etebu E, Arikekpar I. 2016.*** Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. Int J Appl Microbiol Biotechnol Res 4: 90-101.
66. ***European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC); European Food Safety Authority (EFSA); European Medicines Agency (EMA). 2017.*** ECDC/EFSA/EMA second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals: Joint Interagency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis (JIACRA) Report. EFSA J 15(7): e04872. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4872.

67. ***European Comission. 2017.*** A European One Health action plan against antimicrobial resistance (AMR). [Internet] [03 diciembre 2022] Disponible en: https://health.ec.europa.eu/system/files/2020-01/amr_2017_action-plan_0.pdf.
68. ***Eyre DW. 2022.*** Infection Prevention and Control Insights from a Decade of Pathogen Whole-Genome Sequencing. J. Hosp. Infect. 122: 180–186.
69. ***Fan R, Li D, Wang Y, He T, Feßler AT, Schwarz S, Wu C. 2016.*** Presence of the *optrA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus sciuri* of porcine origin. Antimicrob. Agents Chemother. 60: 7200–7205.
70. ***FAOSTAT, 2020.*** Livestock Primary. [Internet], [12 diciembre 2022]. Disponible en: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL
71. ***FAOSTAT. 2020.*** Food and agriculture data. [Internet], [12 diciembre 2022]. Disponible en: http://www.fao.org/faostat/en/#home
72. ***Fernandes MR, Sellera FP, Moura Q, Souza TA, Lincopan N. 2018.*** Draft genome sequence of a CTX-M-8, CTX-M-55 and FosA3 co-producing *Escherichia coli* ST117/B2 isolated from an asymptomatic carrier. J Glob Antimicrob Resist 12:183-184. doi: 10.1016/j.jgar.2018.01.015.
73. ***Finley RL, Collignon P, Larsson DG, McEwen SA, Li XZ, Gaze WH, Reid-Smith R, Timinouni M, Graham DW, Topp E. 2013.*** The scourge of antibiotic resistance: The important role of the environment. Clin. Infect. Dis 57: 704–710.
74. ***Fischer J, Rodríguez I, Schmoger S, Friese A, Roesler U, Helmuth R, Guerra B. 2012.*** *Escherichia coli* producing VIM-1 carbapenemase isolated on a pig farm. J. Antimicrob. Chemother 67: 1793–1795.
75. ***Foley S, Grant K. 2007.*** Molecular techniques of detection and discrimination of foodborne pathogens and their toxins . En: Simjee S. Foodborne diseases. Totowa, NJ: Humana Press. p. 485-510.
76. ***Foley SL, Lynne AM, Nayak R. 2009***. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. Infect Genet Evol. 2009;9:430-40.
77. ***Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2016.*** Drivers, dynamics and epidemiology of antimicrobial resistance in animal production. [Internet], [12 diciembre 2022]. Disponible en: http://www.fao.org/documents/card/en/c/d5f6d40d-ef08-4fcc-866b-5e5a92a12dbf/

78. ***Forsberg KJ, Reyes A, Wang B, Selleck EM, Sommer MOA, Dantas G. 2012.*** The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. Science 337(6098): 1107– 1111. https://doi.org/10.1126/science.1220761

79. ***Fox G, Stackebrandt E, Hespell R, Gibson J, Maniloff J, Dyer TA, Wolfe RS, Balch WE, Tanner RS, Magrum LJ, Zablen LB, Blakemore R, Gupta R, Bonen L, Lewis BJ, Stahl DA, Luehrsen KR, Chen KN and Woese CR. 1980.*** The phylogeny of prokaryotes. Science 209: 457–463.

80. ***Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A. 2005.*** Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. Nat Rev Microbiol. 3:722-732. doi: 10.1038/nrmicro1235.

81. ***Fuga B, Sellera FP, Cerdeira L, Esposito F, Cardoso B, Fontana H, Moura Q, Cardenas-Arias A, Sano E, Ribas RM, Carvalho AC, Tognim MCB, de Morais MMC, Quaresma AJPG, Santana ÂP, Reis JN, Pilonetto M, Vespero EC, Bonelli RR, Cerqueira AMF, Sincero TCM, Lincopan N. 2022.*** WHO Critical Priority *Escherichia coli* as One Health Challenge for a Post-Pandemic Scenario: Genomic Surveillance and Analysis of Current Trends in Brazil. Microbiol Spectr. 10(2):e0125621. doi: 10.1128/spectrum.01256-21.

82. ***Garofalo C, Vignaroli C, Zandri G, Aquilanti L, Bordoni D, Osimani A, Clementi F, Biavasco F. 2007.*** Direct detection of antibiotic resistance genes in specimens of chicken and pork meat. Int J Food Microbiol 113(1):75-83. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.015.

83. ***Gibson MK, Forsberg KJ, Dantas G. 2015.*** Improved annotation of antibiotic resistance determinants reveals microbial resistomes cluster by ecology. ISME Journal 9(1): 207– 216. https://doi.org/10.1038/ismej.2014.106

84. ***Giguère SPJ, Baggot JD, Walker RD, Dowling PM. 2007.*** Antimicrobial Therapy in - Veterinary Medicine. 4ta Edicion. John Willey and Sons.

85. ***Gilbert JA, Blaser MJ, Caporaso JG, Jansson JK, Lynch SV, Knight R. 2018.*** Current understanding of the human microbiome. Nat Med 24:392–400. 10.1038/nm.4517.

86. ***Goossens H, Ferech M, Vander Stichele R, Elseviers M, for the ESAC Working Group. 2005***. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. Lancet 365:579–87. doi: 10.1016/S0140-6736(05)17907-0.

87. ***Gu W, Crawford ED, O'Donovan BD, Wilson MR, Chow ED, Retallack H, et al. 2016.*** Depletion of abundant sequences by hybridization (DASH): using Cas9 to remove unwanted high-abundance species in sequencing libraries and molecular counting applications. Genome Biol. 17:41. doi: 10.1186/s13059-016-0904-5.

88. ***Guenther S, Falgenhauer L, Semmler T, Imirzalioglu C, Chakraborty T, Roesler U, Roschanski N. 2017.*** Environmental emission of multiresistant *Escherichia coli* carrying the

colistin resistance gene *mcr-1* from German swine farms. J Antimicrob Chemother 72(5):1289-1292. doi: 10.1093/jac/dkw585.

89. ***Guarneri F, Bertasio C, Romeo C, Formenti N, Scali F, Parisio G, Canziani S, Boifava Ch, Guadagno F, Boniotti MB, Alborali GL. 2023.*** First Detection of mcr-9 in a Multidrug-Resistant Escherichia coli of Animal Origin in Italy Is Not Related to Colistin Usage on a Pig Farm. Antibiotics (Basel). 12(4): 689. doi: 10.3390/antibiotics12040689
90. ***Guerra B, Fischer J, Helmuth R. 2014.*** An emerging public health problem: Acquired carbapenemase-producing microorganisms are present in food-producing animals, their environment, companion animals and wild birds. Vet. Microbiol 171: 290–297.
91. ***Haack BJ, Andrews RE Jr. 2000.*** Isolation of Tn916-like conjugal elements from swine lot effluent. Can J Microbiol 46(6):542-9. doi: 10.1139/w00-029.
92. ***Handelman J. 2004.*** Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. Microbiol Mol Biol Rev 68:669-685.
93. ***Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy, Goodman RM. 1998.*** Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. Chem Biol 5: R245-R249.
94. ***Hanson R, Kaneene JB, Padungtod P, Hirokawa K, Zeno C. 2002.*** Prevalence of *Salmonella* and *E. coli,* and their resistance to antimicrobial agents, in farming communities in northern Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health Suppl 3:120-6.
95. ***Hasman H, Saputra D, Sicheritz-Ponten T, Lund O, Svendsen CA, Frimodt-Møller N, et al. 2014.*** Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. J Clin Microbiol. 52:139-46. doi: 10.1128/JCM.02452-13.
96. ***Hassan YI, Lahaye L, Gong MM, Peng J, Gong J, Liu S, Gay CG, Yang C. 2018.*** Innovative drugs, chemicals, and enzymes within the animal production chain. Vet Res 31: 49(1):71. doi: 10.1186/s13567-018-0559-1.
97. ***Hauser AR. 2015.*** Cell envelope. In: Antibiotic Basic for Clinicians. 2nd ed. New Delhi: Wolters Kluwer (India) Pvt. Ltd. p. 3-5.
98. ***He T, Shen Y, Schwarz S, Cai J, Lv Y, Li J, Feßler AT, Zhang R, Wu C, Shen J, Wang Y. 2016.*** Genetic environment of the transferable oxazolidinone/phenicol resistance gene optrA in *Enterococcus faecalis* isolates of human and animal origin. J Antimicrob Chemother 71(6):1466-73. doi: 10.1093/jac/dkw016.
99. ***Heather, J. M., Chain, B. 2016.*** The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. Genomics, 107(1), 1-8. doi: 10.1016/j.ygeno.2015.11.003.

100. ***Heym B, Le Moal M, Armand-Lefevre L, Nicolas-Chanoine MH. 2002.*** Multilocus sequence typing (MLST) shows that the 'Iberian' clone of methicillin-resistant Staphylococcus aureus has spread to France and acquired reduced susceptibility to teicoplanin. J Antimicrob Chemother. 50(3):323-9. doi: 10.1093/jac/dkf132.

101. ***Ho PL, Wong RC, Chow KH, Que TL. 2009.*** Distribution of integron-associated trimethoprim-sulfamethoxazole resistance determinants among *Escherichia coli* from humans and food-producing animals. Lett Appl Microbiol 49:627-634

102. ***Hollis A, Ahmed Z. 2013.*** Preserving antibiotics, rationally. N Engl J Med 369 (26): 2474-2476.

103. ***Hollis G. 1997.*** Environmental stress. Swine Livestock Trail. University of Illinois Extension. [Internet], [21 noviembre 2022]. Disponible en: http://livestocktrail.illinois.edu/porknet/paperDisplay.cfm?ContentID=500

104. ***Holman DB, Chénier MR. 2015.*** Antimicrobial use in swine production and its effect on the swine gut microbiota and antimicrobial resistance. Can J Microbiol 61(11):785-98. doi: 10.1139/cjm-2015-0239.

105. ***Hounmanou YMG, Bortolaia V, Dang STT, Truong D, Olsen JE, Dalsgaard A. 2021.*** ESBL and AmpC β-Lactamase Encoding Genes in *E. coli* From Pig and Pig Farm Workers in Vietnam and Their Association with Mobile Genetic Elements. Front Microbiol 12: 629139. doi: 10.3389/fmicb.2021.629139.

106. ***Infante B, Grape M, Larsson M, Kristiansson C, Pallecchi L, Rossolini GM, Kronvall G. 2005.*** Acquired sulphonamide resistance genes in faecal *Escherichia coli* from healthy children in Bolivia and Peru. Int J Antimicrob Agents 25(4):308-12. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2004.12.004.

107. ***International Office of Epizootics (OIE). 2015***. OIE standards, Guidelines and Resolution on Antimicrobial Resistance and the Use of Antimicrobial Agents. [Internet], [12 diciembre 2022]. Disponible en: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/PortailAMR/EN-book-AMR.PDF

108. ***Jahne MA, Rogers SW, Ramler IP, Holder E, Hayes G. 2015.*** Hierarchal clustering yields insight into multidrug-resistant bacteria isolated from a cattle feedlot wastewater treatment system. Environ Monit Assess 187(1):4168. doi: 10.1007/s10661-014-4168-9.

109. ***Johnson JR, Drawz SM, Porter S, Kuskowski MA. 2013.*** Susceptibility to alternative oral antimicrobial agents in relation to sequence type ST131 status and Coresistance phenotype among recent *Escherichia coli* isolates from U.S. veterans. Antimicrob Agents Chemother 57(10):4856-60. doi: 10.1128/AAC.00650-13.

110. ***Jolley KA, Bliss CM, Bennett JS, Bratcher HB, Brehony C, Colles FM, et al. 2012.*** Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain. Microbiol;158(4):1005-1015.

111. ***Jonas O, Irwin A, Berthe F, Le Gall F, Marquez P. 2017.*** Drug-resistant infections: A threat to our economic future (Vol. 2): final report. HNP/Agriculture Global Antimicrobial Resistance Initiative Washington, D.C. : World Bank Group.

112. ***Jutras BL, Lochhead RB, Kloos ZA, Biboy J, Strle K, Booth CJ, Govers SK, Gray J, Schumann P, Vollmer W, Bockenstedt LK, Steere AC, Jacobs-Wagner C. 2019.*** *Borrelia burgdorferi* peptidoglycan is a persistent antigen in patients with Lyme arthritis. Proc Natl Acad Sci USA 116(27):13498-13507. doi: 10.1073/pnas.1904170116.

113. ***Kadhum H, Hasan T. 2019.*** The study of Bacillus subtilis Antimicrobial Activity on some of the Patological Isolates. Int J Drug Deliver Tech 9(02): 193-196.

114. ***Karami N, Nowrouzian F, Adlerberth I, Wold AE. 2006.*** Tetracycline resistance in *Escherichia coli* and persistence in the infantile colonic microbiota. Antimicrob Agents Chemother 50:156-161.

115. ***Kchouk M, Gibrat J.F., Elloumi M. 2017.*** Generations of sequencing technologies: from first to next generation Biol Med (Aligarh) [Internet], [16 de Octubre 2023]. Disponible en https://www.omicsonline.com/open-access/generations-of-sequencing-technologies-from-first-to-next-generation-0974-8369-1000395.php?aid=87862

116. ***Khan GA, Berglund B, Khan KM, Lindgren PE, Fick J. 2013.*** Occurrence and abundance of antibiotics and resistance genes in rivers, canal and near drug formulation facilities--a study in Pakistan. PLoS One 8(6): e62712. doi: 10.1371/journal.pone.0062712.

117. ***Koike S, Krapac IG, Oliver HD, Yannarell AC, Chee-Sanford JC, Aminov RI, Mackie RI. 2007.*** Monitoring and source tracking of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater adjacent to swine production facilities over a 3-year period. Appl Environ Microbiol 73(15):4813-23. doi: 10.1128/AEM.00665-07.

118. ***Krause KM, Serio AW, Kane TR, Connolly LE. 2016.*** Aminoglycosides: An Overview. Cold Spring Harb Perspect Med 6(6):a027029. doi: 10.1101/cshperspect.a027029.

119. ***Lai CKC, Ng RW, Leung SS, Hui M, Ip M. 2022.*** Overcoming the rising incidence and evolving mechanisms of antibiotic resistance by novel drug delivery approaches - An overview. Adv. Drug Deliv Rev 181: 114078.

120. ***Landersdorfer CB, Nation RL. 2015***. Colistin: how should it be dosed for the critically ill? Semin Respir Crit Care Med; 36(1):126-35.

121. ***Larsen MV, Cosentino S, Lukjancenko O, Saputra D, Rasmussen S, Hasman H, et al. 2014.*** Benchmarking of methods for genomic taxonomy. J Clin Microbiol. 52:1529-39.

122. ***LeBlanc SJ, Lissemore KD, Kelton DF, Duffield TF, Leslie KE. 2006.*** Major advances in disease prevention in dairy cattle. J. Dairy Sci 89:1267–1279. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72195-6.

123. ***Leekitcharoenphon P, Johansson MHK, Munk P, Malorny B, Skarżyńska M, Wadepohl K, Moyano G, Hesp A, Veldman KT, Bossers A; EFFORT Consortium; Zając M, Wasyl D, Sanders P, Gonzalez-Zorn B, Brouwer MSM, Wagenaar JA, Heederik DJJ, Mevius D, Aarestrup FM. 2021.*** Genomic evolution of antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. Sci Rep 11(1):15108. doi: 10.1038/s41598-021-93970-7.

124. ***Lees JA, Ferwerda B, Kremer PHC, Wheeler NE, Serón MV, Croucher NJ, et al. 2019.*** Joint sequencing of human and pathogen genomes reveals the genetics of pneumococcal meningitis. Nat Commun. 2019; 10(1):2176. doi: 10.1038/ s41467-019-09976-3.

125. ***Leflon-Guibout V, Blanco J, Amaqdouf K, Mora A, Guize L, Nicolas-Chanoine MH. 2008.*** Absence of CTX-M enzymes but high prevalence of clones, including clone ST131, among fecal *Escherichia coli* isolates from healthy subjects living in the area of Paris, France. J Clin Microbiol 46(12):3900-5. doi: 10.1128/JCM.00734-08.

126. ***Lentz SAM, Dalmolin TV, Barth AL, Martins AF. 2021.*** *mcr1* Gene in Latin America: How Is It Disseminated Among Humans, Animals, and the Environment? Front Public Health. 9:648940. doi: 10.3389/fpubh.2021.648940.

127. ***Levy SB, McMurry LM, Barbosa TM, Burdett V, Courvalin P, Hillen W, Roberts MC, Rood JI, Taylor DE. 1999.*** Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. Antimicrob Agents Chemother 43(6):1523-4. doi: 10.1128/AAC.43.6.1523.

128. ***Li XS, Liu BG, Dong P, Li FL, Yuan L, Hu GZ. 2018.*** The prevalence of *mcr1* and resistance characteristics of *Escherichia coli* isolates from diseased and healthy pigs. Diagn Microbiol Infect Dis 91(1):63-65. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.12.014.

129. ***Li Y, Ma X, Li C, Dai X, Zhang L. 2020.*** Occurrence and genomic characterization of ESBL-producing *Escherichia coli* ST29 strains from swine with abundant virulence genes. Microb Pathog 148:104483. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104483.

130. ***Lim SK, Kim D, Moon DC, Cho Y, Rho M. 2020.*** Antibiotic resistomes discovered in the gut microbiomes of Korean swine and cattle. Gigascience 9(5):giaa043. doi: 10.1093/gigascience/giaa043.

131. ***Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. 2016.*** Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis 16(2):161-8. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7.

132. ***Liu Z, Liu Y, Xi W, Liu S, Liu J, Mu H, Chen B, He H, Fan Y, Ma W, Zhang W, Fu M, Wang J, Song X. 2021.*** Genetic Features of Plasmid- and Chromosome-Mediated *mcr1* in *Escherichia coli* Isolates from Animal Organs with Lesions. Front Microbiol 12:707332. doi: 10.3389/fmicb.2021.707332.

133. ***Liu, Y.; Wang, Y.; Dai, L.; Wu, C.; Shen, J. 2014.*** First report of multiresistance gene *cfr* in *Enterococcus species casseliflavus* and *gallinarum* of swine origin. Vet. Microbiol 170, 352–357.

134. ***Looft T, Johnson TA, Allen HK, Bayles DO, Alt DP, Stedtfeld RD, Sul WJ, Stedtfeld TM, Chai B, Cole JR, Hashsham SA, Tiedje JM, Stanton TB. 2012.*** In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. Proc Natl Acad Sci USA 109(5):1691-6. doi: 10.1073/pnas.1120238109.

135. ***López M, Kadlec K, Schwarz S, Torres C. 2012.*** First detection of the staphylococcal trimethoprim resistance gene *dfrK* and the *dfrK*-carrying transposon Tn559 in *enterococci*. Microb. Drug Resist 18: 13–18.

136. ***Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Barker-Collo S, Bartels DH, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bhalla K, Bikbov B, Bin Abdulhak A, Birbeck G, Blyth F, Bolliger I, Boufous S, Bucello C, Burch M, Burney P, Carapetis J, Chen H, Chou D, Chugh SS, Coffeng LE, Colan SD, Colquhoun S, Colson KE, Condon J, Connor MD, Cooper LT, Corriere M, Cortinovis M, de Vaccaro KC, Couser W, Cowie BC, Criqui MH, Cross M, Dabhadkar KC, Dahodwala N, De Leo D, Degenhardt L, Delossantos A, Denenberg J, Des Jarlais DC, Dharmaratne SD, Dorsey ER, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Erwin PJ, Espindola P, Ezzati M, Feigin V, Flaxman AD, Forouzanfar MH, Fowkes FG, Franklin R, Fransen M, Freeman MK, Gabriel SE, Gakidou E, Gaspari F, Gillum RF, Gonzalez-Medina D, Halasa YA, Haring D, Harrison JE, Havmoeller R, Hay RJ, Hoen B, Hotez PJ, Hoy D, Jacobsen KH, James SL, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Karthikeyan G, Kassebaum N, Keren A, Khoo JP, Knowlton LM, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Lipnick M, Lipshultz SE, Ohno SL, Mabweijano J, MacIntyre MF, Mallinger L, March L, Marks GB, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi BM, McAnulty JH, McDermott MM, McGrath J, Mensah GA, Merriman TR, Michaud C, Miller M, Miller TR, Mock C, Mocumbi AO, Mokdad AA, Moran A, Mulholland K, Nair MN, Naldi L, Narayan KM, Nasseri K, Norman P, O'Donnell M, Omer SB, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Pahari B, Pandian JD, Rivero AP, Padilla RP, Perez-Ruiz F, Perico N, Phillips D, Pierce K, Pope CA 3rd, Porrini E, Pourmalek F, Raju M, Ranganathan D, Rehm JT, Rein DB, Remuzzi G, Rivara FP,***

Roberts T, De León FR, Rosenfeld LC, Rushton L, Sacco RL, Salomon JA, Sampson U, Sanman E, Schwebel DC, Segui-Gomez M, Shepard DS, Singh D, Singleton J, Sliwa K, Smith E, Steer A, Taylor JA, Thomas B, Tleyjeh IM, Towbin JA, Truelsen T, Undurraga EA, Venketasubramanian N, Vijayakumar L, Vos T, Wagner GR, Wang M, Wang W, Watt K, Weinstock MA, Weintraub R, Wilkinson JD, Woolf AD, Wulf S, Yeh PH, Yip P, Zabetian A, Zheng ZJ, Lopez AD, Murray CJ, AlMazroa MA, Memish ZA. 2012. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. Lancet 380(9859):2095-128. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61728-0.

137. ***Lunney JK. 2007.*** Advances in swine biomedical model genomics. Int J Biol Sci 3: 179–184.

138. ***Lupo A, Saras E, Madec JY, Haenni M. 2018.*** Emergence of blaCTX-M-55 associated with fosA, rmtB and mcr gene variants in *Escherichia coli* from various animal species in France. J Antimicrob Chemother 73(4):867-872. doi: 10.1093/jac/dkx489.

139. ***Magnet S, Blanchard JS. 2005.*** Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. Chem Rev 105, 477–497 10.1021/cr0301088.

140. ***Magurran, A.E. 1988.*** Ecological Diversity and Its Measurements. Princeton University Press, Princeton, NJ.

141. ***Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. 1998.*** Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Mar 17;95(6):3140-5. doi: 10.1073/pnas.95.6.3140. PMID: 9501229; PMCID: PMC19708.

142. ***Majeed HT, Aljanaby AAJ. 2019.*** Antibiotic Susceptibility Patterns and Prevalence of Some Extended Spectrum Beta-Lactamases Genes in Gram- Negative Bacteria Isolated from Patients Infected with Urinary Tract Infections in Al-Najaf City, Iraq. Avicenna J Medi Biotech 11(2): 192.

143. ***Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al. 1998.*** Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proceedings of the National Academy of Sciences. 95(6):3140-145.

144. ***Mashayekhi, F., Ronaghi, M. 2007.*** Analysis of Read-Length Limiting Factors in Pyrosequencing Chemistry. Analytical Biochemistry, 363(2), 275-287. https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.02.002.

145. ***Mason A, Foster D, Bradley P, Golubchik T, Doumith M, Gordon NC, et al. 2018.*** Accuracy of different bioinformatics methods in detecting antibiotic resistance and virulence factors from Staphylococcus aureus whole-genome sequences. J Clin Microbiol. 56(9):e01815-17. doi: 10.1128/JCM.01815-17.

146. ***McDermott PF, Walker RD, White DG. 2003.*** Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. Int. J. Toxicol. 22, 135–143 10.1080/10915810305089.

147. ***McGowan JE, Tenover FC. 1997.*** Control of antimicrobial resistance in the health care system. Infect Dis Clin North Am 11: 297 – 311.

148. ***Medina J, Paciel D, Noceti O, Rieppi G. 2017.*** Actualización acerca de colistina (polimixina E): aspectos clínicos, PK/PD y equivalencias. Rev Méd Urug [Internet] 33(3):195-206. Disponible en: http://www.scielo.edu.uy/pdf/rmu/v33n3/1688-0390-rmu33-03-00079.pdf

149. ***Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA, Zentz EB, Leopold SR, Rico A, Prior K, Szczepanowski R, Ji Y, Zhang W, McLaughlin SF, Henkhaus JK, Leopold B, Bielaszewska M, Prager R, Brzoska PM, Moore RL, Guenther S, Rothberg JM, Karch H. 2011.*** Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic Escherichia coli O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. PLoS One. 6(7):e22751. doi: 10.1371/journal.pone.0022751.

150. ***Mena C, Rodrigues D, Silva J, Gibbs P, Teixeira P. 2008.*** Occurrence, identification, and characterization of Campylobacter species isolated from Portuguese poultry samples collected from retail establishments. Poult Sci 87:187–90.

151. ***Menck-Costa MF, Baptista AAS, Gazal LES, Justino L, Sanches MS, de Souza M, Nishio EK, Queiroz Dos Santos B, Cruz VD, Berbert JVM, Gonçalves BC, Andrade G, Vespero EC, Nakazato G, Kobayashi RKT. 2022.*** High-Frequency Detection of *fosA3* and $bla_{CTX\text{-}M\text{-}55}$ Genes in *Escherichia coli* From Longitudinal Monitoring in Broiler Chicken Farms. Front Microbiol 13:846116. doi: 10.3389/fmicb.2022.846116.

152. ***Michael GB, Freitag C, Wendlandt S, Eidam C, Feßler AT, Lopes GV, Kadlec K, Schwarz S. 2015.*** Emerging issues in antimicrobial resistance of bacteria from food-producing animals. Future Microbiol 10: 427–443.

153. ***Milenkov M, Rasoanandrasana S, Rahajamanana LV, Rakotomalala RS, Razafindrakoto CA, Rafalimanana C, Ravelomandranto E, Ravaoarisaina Z, Westeel E, Petitjean M, Mullaert J, Clermont O, Raskine L, Samison LH, Endtz H, Andremont A, Denamur E, Komurian-Pradel F, Armand-Lefevre L. 2021.*** Prevalence, Risk Factors, and Genetic Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamase *Escherichia coli* Isolated

from Healthy Pregnant Women in Madagascar. Front Microbiol 12:786146. doi: 10.3389/fmicb.2021.786146.

154. ***Minabe M, Takeuchi K, Kumada H, Umemoto T. 1994.*** The effect of root conditioning with minocycline HCl in removing endotoxin from the roots of periodontally-involved teeth. J Periodontol 65: 387–392.

155. ***Mohsin M, Raza S, Schaufler K, Roschanski N, Sarwar F, Semmler T, Schierack P, Guenther S. 2017.*** High Prevalence of CTX-M-15-Type ESBL-Producing *E. coli* from Migratory Avian Species in Pakistan. Front Microbiol 8:2476. doi: 10.3389/fmicb.2017.02476.

156. ***Moradigaravand D, Palm M, Farewell A, Mustonen V, Warringer J, Parts L. 2018.*** Prediction of antibiotic resistance in *Escherichia coli* from large-scale pan-genome data. PLoS Comput Biol. 14(12):e1006258. doi: 10.1371/journal. pcbi.1006258.

157. ***Munita J, Arias C. 2016.*** Mechanism of antibiotic resistance. Microbiol Spectrum 4(2): 4.2.15. doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.

158. ***Munk P, Knudsen BE, Lukjancenko O, Duarte ASR, Van Gompel L, Luiken REC, Smit LAM, Schmitt H, Garcia AD, Hansen RB, Petersen TN, Bossers A, Ruppé E; EFFORT Group; Lund O, Hald T, Pamp SJ, Vigre H, Heederik D, Wagenaar JA, Mevius D, Aarestrup FM. 2018.*** Abundance and diversity of the faecal resistome in slaughter pigs and broilers in nine European countries. Nat Microbiol 3(8):898-908. doi: 10.1038/s41564-018-0192-9.

159. ***Ng HF. 2019.*** Selection and Characterization of a Tigecycline-Resistant Mutant of Mycobacterium Abscessus to Identify Possible Resistance Determinants. Tesis de Doctorado en Medicina. Universiti Tunku Abdul Rahman. 187 p.

160. ***Nielsen HB, Almeida M, Juncker AS, Rasmussen S, Li J, Sunagawa S, Plichta DR, Gautier L, Pedersen AG, Le Chatelier E, Pelletier E, Bonde I, Nielsen T, Manichanh C, Arumugam M, Batto JM, Quintanilha Dos Santos MB, Blom N, Borruel N, Burgdorf KS, Boumezbeur F, Casellas F, Doré J, Dworzynski P, Guarner F, Hansen T, Hildebrand F, Kaas RS, Kennedy S, Kristiansen K, Kultima JR, Léonard P, Levenez F, Lund O, Moumen B, Le Paslier D, Pons N, Pedersen O, Prifti E, Qin J, Raes J, Sørensen S, Tap J, Tims S, Ussery DW, Yamada T; MetaHIT Consortium; Renault P, Sicheritz-Ponten T, Bork P, Wang J, Brunak S, Ehrlich SD; MetaHIT Consortium. 2014.*** Identification and assembly of genomes and genetic elements in complex metagenomic samples without using reference genomes. Nat Biotechnol 32(8):822-8. doi: 10.1038/nbt.2939.

161. ***Niu Q, Li P, Hao S, Zhang Y, Kim SW, Li H, Ma X, Gao S, He L, Wu W, Huang X, Hua J, Zhou B, Huang R. 2015.*** Dynamic distribution of the gut microbiota and the relationship with apparent crude fiber digestibility and growth stages in pigs. Sci Rep 5:9938. doi: 10.1038/srep09938.

162. ***Nocker A, Burr M, Camper AK. 2007.*** Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. Microb Ecol 54: 276–289.

163. ***Nowicki S, deLaurent ZR, de Villiers EP, Githinji G, Charles KJ. 2021.*** The utility of *Escherichia coli* as a contamination indicator for rural drinking water: Evidence from whole genome sequencing. PLoS One 16(1):e0245910. doi: 10.1371/journal.pone.0245910.

164. ***Ochoa TJ, Ruiz J, Molina M, Del Valle LJ, Vargas M, Gil AI, Ecker L, Barletta F, Hall E, Cleary TG, Lanata CF. 2009.*** High frequency of antimicrobial drug resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* in infants in Peru. Am J Trop Med Hyg 81(2):296-301.

165. ***OMS. 2001.*** Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. Organización Mundial de la Salud. Rev Panam Salud Publica. 10:284-293.

166. ***OPS. 2016***. Alerta epidemiológica Enterobacterias con resistencia transferible a colistina, Implicaciones para la salud pública en las Américas. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la salud. Disponible en: file:///C:/Users/GERALDINE/Downloads/2016-jun-10-alerta-epi-enterob-resist.pdf

167. ***OPS. 2021***. Protocolo para el fortalecimiento de la vigilancia de la resistencia antimicrobiana basada en aislamientos en las Américas. Primera fase: hemocultivos. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. https://doi.org/10.37774/9789275322697.

168. ***OPS***. **2022**. Resistencia antimicrobiana en producción animal. Resistencia a los antimicrobianos una amenaza global a la salud pública. Disponible en: https://www.paho.org/es/panaftosa/resistencia-antimicrobiana-produccion-animal

169. ***O'Neil D, Glowatz, H, Schlumpberger M. 2013.*** Ribosomal RNA depletion for efficient use of RNA-seq capacity. Curr Protoc Mol Biol. 4:4.19.1-4-19.8. doi: 10.1002/0471142727.mb0419s103.

170. ***Pace, N.R., et al. 1985***. Analyzing natural microbial populations by rRNA sequences. ASM News 51, 4-12.

171. ***Pagalilauan GL, Limaye AP. 2013.*** Infections in transplant patients. Med Clin North Am 97(4):581-600, x. doi: 10.1016/j.mcna.2013.03.002.

172. ***Pallecchi L, Malossi M, Mantella A, Gotuzzo E, Trigoso C, Bartoloni A, Paradisi F, Kronvall G, Rossolini GM. 2004.*** Detection of CTX-M-type beta-lactamase genes in fecal

Escherichia coli isolates from healthy children in Bolivia and Peru. Antimicrob Agents Chemother 48(12):4556-61. doi: 10.1128/AAC.48.12.4556-4561.2004.

173. ***Pankhurst LJ, Del Ojo Elias C, Votintseva AA, Walker TM, Cole K, Davies J, et al. 2016.*** COMPASS-TB Study Group. Rapid, comprehensive, and affordable mycobacterial diagnosis with whole-genome sequencing: a prospective study. Lancet Respir Med. 4:49-58. doi: 10.1016/S2213-2600(15)00466-X.

174. ***Papa-Ezdra R, Grill Diaz F, Vieytes M, García-Fulgueiras V, Caiata L, Ávila P, Brasesco M, Christophersen I, Cordeiro NF, Algorta G, Galiana A, Vignoli R. 2020.*** First three *Escherichia coli* isolates harbouring *mcr1* in Uruguay. J Glob Antimicrob Resist 20:187-190. doi: 10.1016/j.jgar.2019.07.016..

175. ***Paterson DL, Bonomo RA. 2005.*** Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev 18(4):657-86. doi: 10.1128/CMR.18.4.657-686.2005.

176. ***Pehrsson EC, Forsberg KJ, Gibson MK, Ahmadi S, Dantas G. 2013.*** Novel resistance functions uncovered using functional metagenomic investigations of resistance reservoirs. Front Microbiol 4:145. doi: 10.3389/fmicb.2013.00145.

177. ***Penders J, Stobberingh EE, Savelkoul PH, Wolffs PF. 2013.*** The human microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance. Front Microbiol 4:87. doi: 10.3389/fmicb.2013.00087.

178. ***Peng Z, Hu Z, Li Z, Zhang X, Jia C, Li T, Dai M, Tan C, Xu Z, Wu B, Chen H, Wang X. 2022.*** Antimicrobial resistance and population genomics of multidrug-resistant *Escherichia coli* in pig farms in mainland China. Nat Commun 13(1):1116. doi: 10.1038/s41467-022-28750-6.

179. ***Pérez-Llarena FJ, Bou G. 2016.*** Proteomics as a tool for studying bacterial virulence and antimicrobial resistance. Front Microbiol 7: 410.

180. ***Pfaller MA. 2001.*** Molecular approaches to diagnosing and managing infectious diseases: practicality and costs . Emerg Infect Dis. Mar-Apr;7(2):312.

181. ***Picard B, Garcia JS, Gouriou S, Duriez P, Brahimi N, Bingen E, Elion J, Denamur E. 1999.*** The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. Infect Immun. 67(2):546-553. doi: 10.1128/IAI.67.2.546-553.1999.

182. ***Pieper R, Janczyk P, Urubschurov V, Hou Z, Korn U, Pieper B, Souffrant WB. 2010.*** Effect of *Lactobacillus plantarum* on intestinal microbial community composition and response to enterotoxigenic *Escherichia coli* challenge in weaning piglets. Livest. Sci 133:98–100. doi:10.1016/j.livsci.2010.06.034.

183. ***Poirel L, Corvec S, Rapoport M, Mugnier P, Petroni A, Pasteran F, Faccone D, Galas M, Drugeon H, Cattoir V, Nordmann P. 2007.*** Identification of the novel narrow-spectrum beta-lactamase SCO-1 in *Acinetobacter spp*. from Argentina. Antimicrob Agents Chemother 51(6):2179-84. doi: 10.1128/AAC.01600-06.

184. ***Pulss S, Semmler T, Prenger-Berninghoff E, Bauerfeind R, Ewers C. 2017.*** First report of an *Escherichia coli* strain from swine carrying an OXA-181 carbapenemase and the colistin resistance determinant MCR-1. Int J Antimicrob Agents 50(2):232-236. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.03.014.

185. ***Qiao J, Li H, Wang Z, Wang W. 2015.*** Effects of Lactobacillus acidophilus dietary supplementation on the performance, intestinal barrier function, rectal microflora and serum immune function in weaned piglets challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. A van Leeuw 107:883–891.

186. ***Quesada A, Ugarte-Ruiz M, Iglesias MR, Porrero MC, Martínez R, Florez-Cuadrado D, Campos MJ, García M, Píriz S, Sáez JL, Domínguez L. 2016.*** Detection of plasmid mediated colistin resistance (MCR-1) in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine in Spain. Res Vet Sci 105:134-5. doi: 10.1016/j.rvsc.2016.02.003.

187. ***Quiroga C, Nastro M, Di Conza J. 2019.*** Current scenario of plasmid-mediated colistin resistance in Latin America. Rev Argent Microbiol 51(1):93-100. doi: 10.1016/j.ram.2018.05.001.

188. ***Rassoulian Barrett S, Hoffman NG, Rosenthal C, Bryan A, Marshall DA, Lieberman J, et al. 2020.*** Sensitive identification of bacterial DNA in clinical specimens by broad-range 16S rRNA gene enrichment. J Clin Microbiol. 58(12):e01605-20. doi: 10.1128/JCM.01605-20.

189. ***Rello J, Bunsow E, Perez A. 2016.*** What if there were no new antibiotics? A look at alternatives. Expert Rev Clin Pharmacol 9(12): 1547-1555. doi: 10.1080/17512433.2016.1241141.

190. ***Rizzo L, Manaia C, Merlin C, Schwartz T, Dagot C, Ploy MC, Michael I, Fatta-Kassinos D. 2013.*** Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. Sci Total Environ 447:345-60. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.01.032.

191. ***Roberts MC, Schwarz S, Aarts HJ. 2012.*** Acquired antibiotic resistance genes: an overview. Front Microbiol 3:384. doi: 10.3389/fmicb.2012.00384.

192. ***Robinson IM, Allison MJ and Bucklin JA. 1981.*** Characterization of the cecal bacteria of normal pigs. Appl Environ Microbiol 41: 950–955.

193. ***Roschanski N, Falgenhauer L, Grobbel M, Guenther S, Kreienbrock L, Imirzalioglu C, Roesler U. 2017.*** Retrospective survey of *mcr-1* and *mcr-2* in German pig-fattening farms, 2011-2012. Int J Antimicrob Agents 50(2):266-271. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.03.007.

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

195. ***Royet J, Gupta D, Dziarski R. 2011.*** Peptidoglycan recognition proteins: modulators of the microbiome and inflammation. Nat Rev Immunol 11, 837–851. doi: 10.1038/nri3089.

196. ***Ruston A, Shortall O, Green M, Brennan M, Wapenaar W, Kaler J. 2016.*** Challenges facing the farm animal veterinary profession in England: a qualitative study of veterinarians' perceptions and responses. Prev Vet Med 127:84–93. doi:10.1016/j.prevetmed.2016.03.0

197. ***Salloum S, Tawk M, Tayyara L. 2020.*** Bacterial resistance to antibiotics and associated factors in two hospital centers in Lebanon from January 2017 to June 2017. Infect Prev Pract 2(2):100043. doi: 10.1016/j.infpip.2020.100043.

198. ***Salyers AA, Moon K, Schlessinger D. 2007.*** The human intestinal tract—a hotbed of resistance gene transfer? Part II. Clin Microbiol Newsletter 29(4): 25-30. doi: 10.1016/j.clinmicnews.2007.02.001

199. ***Sawant AA, Sordillo LM, Jayarao BM. 2005.*** A survey on antibiotic usage in dairy herds in Pennsylvania. J. Dairy Sci. 88, 2991–2999.

200. ***Schneider T, Sahl HG. 2010.*** An oldie but a goodie—cell wall biosynthesis as antibiotic target pathway. Int J Med Microbiol 300: 161–169. doi: 10.1016/j.ijmm.2009.10.005.

201. ***Schuster SC. 2008.*** Next-generation sequencing transforms today's biology. Nature Methods 5: 16–18.

202. ***Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A. 2004***. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. FEMS Microbiol Rev 28:519-42.

203. ***Schwarz S, Enne VI, van Duijkeren E. 2016.*** 40 years of veterinary papers in JAC—What have we learnt? J Antimicrob Chemother 71, 2681–2690.

204. ***SENASA.* 2019**. MINAGRI: Prohíben importación, comercialización y fabricación de colistina en el país. Disponible en: https://www.senasa.gob.pe/senasacontigo/minagri-prohiben-importacion-comercializacion-y-fabricacion-de-colistina-en-el-pais/

205. ***Service RF. 2006.*** Gene sequencing. The race for the $1000 genome. Science. 311(5767):1544-6. doi: 10.1126/science.311.5767.1544.

206. ***Sharkey LK, O'Neill AJ. 2019.*** Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance Part II. En Bonev B, Brown N. eds. Bacterial Resistance to Antibiotics from Molecules to Man. John Wiley & Sons Ltd. p 27-50.

207. ***Shen J, Wang Y, Schwarz S. 2013.*** Presence and dissemination of the multiresistance gene cfr in Gram-positive and Gram-negative bacteria. J Antimicrob Chemother 68: 1697–1706.

208. ***Shettigar K, Murali TS. 2020.*** Virulence factors and clonal diversity of Staphylococcus aureus in colonization and wound infection with emphasis on diabetic foot infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 39:2235-46. doi: 10.1007/ s10096-020-03984-8.

209. ***Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. 2006.*** Application of molecular techniques to the study of hospital infection. Clin Microbiol Rev.19:512-30.

210. ***Simpson JM, Kocherginskaya S, Aminov RI, Skerlos LT, Bradley TM, Mackie RI, White BA. 2002.*** Comparative microbial diversity in the gastrointestinal tracts of food animal species. Integr Comp Biol 42: 327–331.

211. ***Simpson JM, McCracken VJ, White BA, Gaskins HR, Mackie RI. 1999.*** Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. J Microbiol Methods 36: 167.

212. ***So AD, Shah TA, Roach S, Ling Chee Y, Nachman KE. 2015.*** An Integrated Systems Approach is Needed to Ensure the Sustainability of Antibiotic Effectiveness for Both Humans and Animals. J Law Med Ethics Suppl 3:38-45. doi: 10.1111/jlme.12273.

213. ***Sorbara MT, Philpott DJ. 2011.*** Peptidoglycan: a critical activator of the mammalian immune system during infection and homeostasis. Immunol Rev 243: 40–60. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01047.x.

214. ***Spellberg B, Bartlett JG, Gilbert DN. 2013.***The future of antibiotics and resistance. N Engl J Med 368: 299-302

215. ***Spigaglia, P. 2016.*** Recent advances in the understanding of antibiotic resistance in Clostridium difficile infection. Ther Adv Infect Dis 3: 23–42.

216. ***Spratt BG. 1994.*** Resistance to antibiotics mediated by target alterations. Science 264, 388–393 10.1126/science.8153626.

217. ***Stanford K, Zaheer R, Klima C, McAllister T, Peters D, Niu YD, Ralston B. 2020.*** Antimicrobial Resistance in Members of the Bacterial Bovine Respiratory Disease Complex Isolated from Lung Tissue of Cattle Mortalities Managed with or without the Use of Antimicrobials. Microorganisms 8(2):288. doi: 10.3390/microorganisms8020288.

218. ***Strelkauskas AJ, Strelkauskas J, Moszyk-Strelkauskas D. 2010.*** Microbiology: a clinical approach. New York: Garland Science.

219. ***Su M, Satola SW, Read TD. 2019.*** Genome-based prediction of bacterial antibiotic resistance. J Clin Microbiol. 57(3):e01405-18. doi: 10.1128/JCM.01405-18.

220. ***Sun C, Cui M, Zhang S, Liu D, Fu B, Li Z, Bai R, Wang Y, Wang H, Song L, Zhang C, Zhao Q, Shen J, Xu S, Wu C, Wang Y. 2020.*** Genomic epidemiology of animal-derived tigecycline-resistant *Escherichia coli* across China reveals recent endemic plasmid-encoded tet(X4) gene. Commun Biol 3(1):412. doi: 10.1038/s42003-020-01148-0.

221. ***Sylvia KE, Demas GE. 2018.*** A gut feeling: microbiome-brain-immune interactions modulate social and affective behaviors. Horm. Behav 99: 41–49.

222. ***Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. 2010.*** The population genetics of commensal *Escherichia coli.* Nat Rev Microbiol. 8(3):207-17. doi: 10.1038/nrmicro2298.

223. ***Thaiss CA, Zmora N, Levy M, Elinav E. 2016.*** The microbiome and innate immunity. Nature 535: 65–74.

224. ***Thoendel, M, Jeraldo PR, Greenwood-Quaintance KE, Yao JZ, Chia N, Hanssen AD, et al. 2016.*** Comparison of microbial DNA enrichment tools for metagenomic whole genome sequencing. J Microbiol Methods. 2016; 127:141-145. doi: 10.1016/j.mimet.2016.05.022.

225. ***Thomas CM, Frost LS. 2014.*** Plasmid Genomes, Introduction to. En Wells R, Bond J, Klinman J, Masters BSS, Bell E. eds. Molecular Life Sciences: A Encyclopedic Reference. p 1 -20.

226. ***Torres C, Zarazaga M. 2002.*** Antibióticos como promotores del crecimiento en animales, ¿vamos por el buen camino? Gac Sanit 16(2):109-12.

227. ***Tóth S, Szepesi Á, Tran-Nguyen VK, Sarkadi B, Német K, Falson P, Boumendjel A. 2020.*** Synthesis and Anticancer Cytotoxicity of Azaaurones Overcoming Multidrug Resistance. Molecules 25(3): 764.

228. ***Touchon M, Perrin A, de Sousa JAM, Vangchhia B, Burn S, O'Brien CL, Denamur E, Gordon D, Rocha EP. 2020.*** Phylogenetic background and habitat drive the genetic diversification of *Escherichia coli*. PLoS Genet. 16(6):e1008866. doi: 10.1371/journal.pgen.1008866.

229. ***Tremaroli V, Backhed F. 2012.*** Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. Nature 489:242–249. 10.1038/nature11552.

230. ***Truong DTQ, Hounmanou YMG, Dang STT, Olsen JE, Truong GTH, Tran NT, Scheutz F, Dalsgaard A. 2021.*** Genetic Comparison of ESBL-Producing *Escherichia coli*

from Workers and Pigs at Vietnamese Pig Farms. Antibiotics (Basel) 10(10):1165. doi: 10.3390/antibiotics10101165.

231. ***Valiakos G, Kapna I. 2021.*** Colistin Resistant mcr Genes Prevalence in Livestock Animals (Swine, Bovine, Poultry) from a Multinational Perspective. A Systematic Review. Vet Sci 8(11):265. doi: 10.3390/vetsci8110265.

232. ***Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP, Teillant A, Laxminarayan R. 2015.*** Global trends in antimicrobial use in food animals. Proc Natl Acad Sci USA 112(18):5649-54. doi: 10.1073/pnas.1503141112.

233. ***Van Cuong N, Nhung NT, Nghia NH, Mai Hoa NT, Trung NV, Thwaites G, Carrique-Mas J. 2016.*** Antimicrobial Consumption in Medicated Feeds in Vietnamese Pig and Poultry Production. Ecohealth 13(3):490-498. doi: 10.1007/s10393-016-1130-z.

234. ***Van Dijk E.L., Jaszczyszyn Y., Naquin D., Thermes C. 2018.*** The third revolution in sequencing technology Trends Genet, 34 (9), pp. 666-681

235. ***Van Hoek AH, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJ. 2011.*** Acquired antibiotic resistance genes: An overview. Front Microbiol 2: 203.

236. ***Velez R, Sloand E. 2016.*** Combating antibiotic resistance, mitigating future theats and ongoing initiatives. J Clin Nurs 25(13-14):1886-9. doi: 10.1111/jocn.13246.

237. ***von Wintersdorff CJ, Penders J, van Niekerk JM, Mills ND, Majumder S, van Alphen LB, Savelkoul PH, Wolffs PF. 2016.*** Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. Front Microbiol 7:173. doi: 10.3389/fmicb.2016.00173.

238. ***von Wintersdorff CJ, Penders J, Stobberingh EE, Oude Lashof AM, Hoebe CJ, Savelkoul PH, Wolffs PF. 2014.*** High rates of antimicrobial drug resistance gene acquisition after international travel, The Netherlands. Emerg Infect Dis 20(4):649-657. doi: 10.3201/eid.2004.131718.

239. ***Wang Q, Lei C, Cheng H, Yang X, Huang Z, Chen X, Ju Z, Zhang H, Wang H. 2022.*** Widespread Dissemination of Plasmid-Mediated Tigecycline Resistance Gene tet(X4) in Enterobacteriales of Porcine Origin. Microbiol Spectr 26;10(5): e0161522. doi: 10.1128/spectrum.01615-22.

240. ***Wang Q, Li Z, Lin J, Wang X, Deng X, Feng Y. 2016.*** Complex dissemination of the diversified *mcr1*-harbouring plasmids in *Escherichia coli* of different sequence types. Oncotarget 7(50):82112-82122. doi: 10.18632/oncotarget.12621.

241. ***Wang Y, Wang X, Schwarz S, Zhang R, Lei L, Liu X, Lin D, Shen J. 2014.*** IMP-45-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* of canine origin. J Antimicrob Chemother 69: 2579–2581.

242. ***Ward P, Roy D. 2005***. Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria . Lait. 85:23-32.

243. ***Webb HE, Bugarel M, den Bakker HC, Nightingale KK, Granier SA, Scott HM, Loneragan GH. 2016.*** Carbapenem-Resistant Bacteria Recovered from Faeces of Dairy Cattle in the High Plains Region of the USA. PLoS ONE 11: e0147363.

244. ***Wendlandt S, Feßler AT, Monecke S, Ehricht R, Schwarz S, Kadlec K. 2013.*** The diversity of antimicrobial resistance genes among staphylococci of animal origin. Int J Med Microbiol 303: 338–349.

245. ***WHO. 2019a.*** Critically important antimicrobials for human medicine: 6th revision 2018-Ranking of medically important antimicrobials for risk management of antimicrobial resistance due to non-human use. Disponible en: https://www.who.int/foodsafety/publications/antimicrobials-sixth/en/

246. ***Wilson DN. 2014.*** Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. Nat Rev Microbiol 12:35–48.

247. ***Wooley JC, Godnik A, Friedberg I. 2010.*** A primer on metagenomics. PLoS ONE 6: e 1000667.

248. ***Wright GD. 2005.*** Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. Adv Drug Deliv Rev 57: 1451–1470 10.1016/j.addr.2005.04.002.

249. ***Wybouw N, Pauchet Y, Heckel DG, Van Leeuwen T. 2016***. Horizontal Gene Transfer Contributes to the Evolution of Arthropod Herbivory. Genome Biol Evol 8: 1785–1801. doi: 10.1093/gbe/evw119.

250. ***Wyrsch ER, Nesporova K, Tarabai H, Jamborova I, Bitar I, Literak I, Dolejska M, Djordjevic SP. 2022.*** Urban Wildlife Crisis: Australian Silver Gull Is a Bystander Host to Widespread Clinical Antibiotic Resistance. mSystems 7(3): e0015822. doi: 10.1128/msystems.00158-22.

251. ***Xu J, He F. 2019.*** Genomic analysis of two bacterial strains co-isolated from a urinary tract infection: NDM-1-producing Enterobacter cloacae accompanied by extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli*. J Glob Antimicrob Resist 17:198-200. doi: 10.1016/j.jgar.2019.04.007.

252. ***Yang H, Huang X, Fang S, Xin W, Huang L, Chen C. 2016.*** Uncovering the composition of microbial community structure and metagenomics among three gut locations in pigs with distinct fatness. Sci Rep 3:6:27427. doi: 10.1038/srep27427.

253. ***Yazdanpour Z, Tadjrobehkar O, Shahkhah M. 2020.*** Significant association between genes encoding virulence factors with antibiotic resistance and phylogenetic groups in

community acquired uropathogenic *Escherichia coli* isolates. BMC Microbiol 20(1):241. doi: 10.1186/s12866-020-01933-1.

254. ***Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, Zhang R, Walsh TR, Shen J, Wang Y. 2017.*** Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. mBio 8(3): e00543-17. doi: 10.1128/mBio.00543-17.

255. ***Zalewska M, Błażejewska A, Czapko A, Popowska M. 2021.*** Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Animal Manure - Consequences of Its Application in Agriculture. Front Microbiol 12:610656. doi: 10.3389/fmicb.2021.610656.

256. ***Zhang J, Zheng B, Zhao L, Wei Z, Ji J, Li L, Xiao Y.2014.*** Nationwide high prevalence of CTX-M and an increase of CTX-M-55 in *Escherichia coli* isolated from patients with community-onset infections in Chinese county hospitals. BMC Infect Dis 14:659. doi: 10.1186/s12879-014-0659-0.

257. ***Zhang WJ, Lu Z, Schwarz S, Zhang RM, Wang XM, Si W, Yu S, Chen L, Liu S. 2013***. Complete sequence of the *bla*$_{NDM-1}$-carrying plasmid pNDM-AB from *Acinetobacter baumannii* of food animal origin. J Antimicrob Chemother 68:1681–1682.

258. ***Zhao Y, Su JQ, An XL, Huang FY, Rensing C, Brandt KK, Zhu YG. 2018.*** Feed additives shift gut microbiota and enrich antibiotic resistance in swine gut. Sci Total Environ 621:1224-1232. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.106.

259. ***Zonghui J, Li Z, Taojie X, Shuai S, Shixiong Y, Lan Y, Ying H, Junjing J, Tengfei D. 2021.*** Antibiotic resistance genes in bacteria: Occurrence, spread, and control. J Basic Microbiol 61:1049–1070. DOI: 10.1002/jobm.202100201

260. ***Zweifel C, Cernela N, Stephan R. 2013***. Detection of the emerging Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11/H- sequence type 29 (ST29) clone in human patients and healthy cattle in Switzerland. Appl Environ Microbiol 79(17):5411-3. doi: 10.1128/AEM.01728-13.

ANEXO 1

Glosario de términos

ADN, abreviación de ácido deoxirribonucleico. Es la forma de almacenamiento de nuestro material genético. Todas las instrucciones para la producción de nuestras proteínas están codificadas en nuestro ADN.

ARGs, genes de resistencia a antibióticos, son genes de microorganismos que confieren mecanismos específicos que les permiten subsistir en presencia de sustancias que buscan eliminar o mermar la acción de sustancias nocivas.

ARN, ácido ribonucleico; macromoléculas que desempeñan diversas funciones vitales en la codificación, descodificación, regulación y expresión de los genes. Al igual que el ADN, es un ácido nucleico y, junto con las proteínas, constituyen los tres grandes tipos de macromoléculas esenciales para todas las formas de vida.

Alelo, una de las diversas formas de un gen en un locus o de un marcador particular en un cromosoma. Diferentes alelos de un gen producen variaciones en las características hereditarias.

BLEE, betalactamasas de espectro extendido.

PFGE, electroforesis en gel de campo pulsado, constituye el estándar de oro para la subtipificación molecular bacteriana porque permite analizar el genoma completo de las bacterias en un único experimento.

ESC(K)APE, grupo de bacterias, siendo *E. faecium, S. aureus, Clostridium difficile, A. baumannii, P. aeruginosa,* y *Enterobacteriaceae.*

Fenotipo, rasgos o características visibles de un organismo. Los rasgos fenotípicos no son necesariamente genéticos.

Filogrupo, subestructura genética en una población, estirpes filogenéticas.

Genoma, componente genético de una célula, es el conjunto de material hereditario de un organismo.

Genotipo, la información hereditaria codificada por el ADN. La identidad genética de un individuo que no se muestra como características externas.

HGT, transferencia horizontal de genes, es un proceso en el que un organismo transfiere material genético a otra célula que no es descendiente.

Locus, posición específica de un gen en un cromosoma.

MDR, multidrogo resistencia, capacidad que tienen las células para desarrollar resistencia a una droga que se usa como agente selectivo.

Metagenómica, es el estudio de la estructura y función de todas las secuencias de nucleótidos aisladas y analizadas de todos los organismos en una muestra a granel.

MGEs, elementos genéticos móviles, son un tipo de material genético que puede moverse dentro de un genoma, o que puede transferirse de una especie o replicón a otro, encontrándose en todos los organismos.

MLST, tipificación multilocus de secuencias, es la tipificación realizada en base a mutaciones o polimorfismos de nucleótido simple presentes en genes constitutivos o *housekeeping*.

ORFs, marcos de lectura abiertos, intervalos de secuencia de ADN entre los codones de inicio y finalización.

Nucleótido, uno de los componentes estructurales o unidades constituyentes del ADN o del ARN. Un nucleótido consta de una base (adenina, timina, guanina, uracilo o citosina), más una molécula de azúcar y una de ácido fosfórico.

PCR, reacción en cadena de la polimerasa, es una técnica utilizada en biología molecular que permite conseguir una gran cantidad de copias de un fragmento de ADN, partiendo de una cantidad ínfima de esta biomolécula.

RAM, capacidad de los microorganismos de producir mecanismos específicos que les permiten sobrevivir en presencia de sustancias nocivas para su desarrollo.

Resistoma, conjunto de genes de resistencia a los antimicrobianos de un grupo de bacterias pertenecientes a un determinado organismo o huésped.

SCG, secuenciamiento del genoma completo, es un proceso de laboratorio que determina la secuencia de ADN completa del genoma de un organismo de una sola vez.

SNPs, polimorfismo de nucleótido único, es la variación en la secuencia de ADN que ocurre cuando se altera un solo nucleótido (adenina, timina, citosina o guanina) de la secuencia del genoma y esa alteración determinada se presenta en por lo menos 1 % de la población. También se llama polimorfismo de un solo nucleótido.

ST, secuenciotipo, perfil alélico.

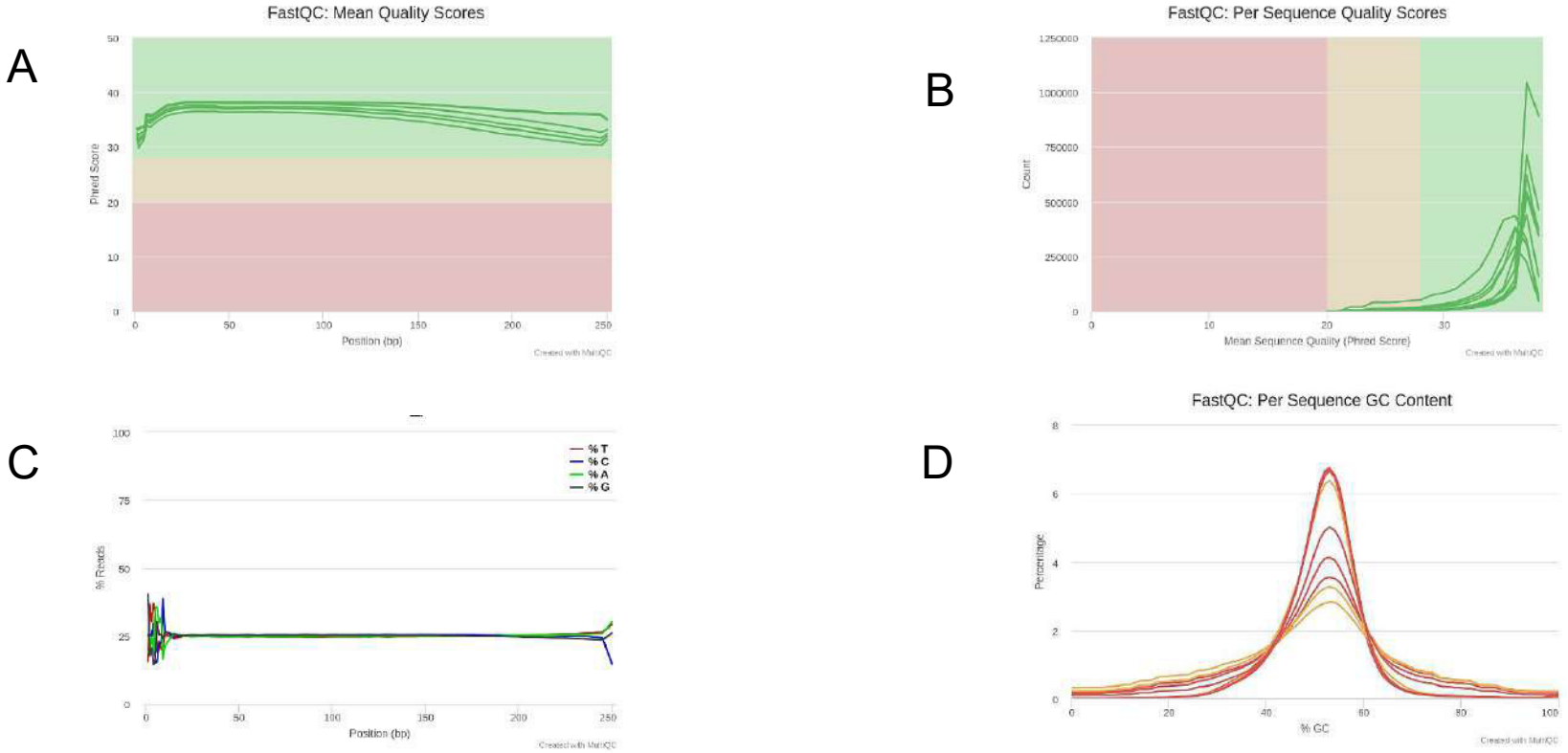
ANEXO 2

Métricas de las secuencias genómicas generadas en este estudio.

Aislado	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Tamaño del Genoma (Mb)	4,99	5,02	5,08	4,96	5,15	5,16	4,98	5,12	5,03	4,97	5,12	5,14	5,10	5,08	4,97	4,99	5,02
N° Contigs	75	89	137	95	137	137	79	86	127	925	113	123	92	135	94	76	88
% GC	50.6	50.6	50.5	50.7	50.4	50.7	50.6	50.6	50.7	50.4	50.5	50.7	50.6	50.5	50.5	50.7	50.6
Secuencias Codificantes (CDS)	4666	4880	4779	4610	4769	4708	4908	4860	4849	4690	4760	4810	4832	4789	4670	4698	4820
ARNr	8	8	8	10	11	9	9	8	8	10	9	8	8	9	10	9	8
ARNt	87	83	84	83	83	86	85	86	84	84	83	86	85	84	83	87	86

ANEXO 3

Métricas de la secuenciación de genomas de los aislados de *E. coli*



A: Puntajes de calidad promedio de las secuencias por pares de bases de los *reads* de los aislados de *E. coli*. **B**: Puntajes de calidad promedio por secuencia de los *reads* de los aislados de *E. coli*. **C:** Contenido por base de las secuencias de los *reads*. No hay diferencias superiores al 10% entre AT y GC. **D:** Contenido de GC por secuencia de los aislados de *E. coli*. El contenido GC de las secuencias, el cual es característico de cada organismo, y en nuestro caso particular debe acercarse al valor del 50.4% y 50.8% para *E. coli* (Mann y Chen, 2010).