

RESISTENCIA FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA EN LOS PATOTIPOS AIEC, STEC Y EAEC DE *E. COLI*

Phenotypic and genotypic resistance in STEC, AIEC and EAEC pathotypes of *E. coli*

Ruiz Herrero E, Caro Vergara MR, Ortega Hernández N

Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria, Campus Espinardo. 30100. Universidad de Murcia. Murcia. España.

Autor para correspondencia: Eduardo Ruiz: eduardo.ruizh@um.es

Tipo artículo: Trabajo Fin de Grado

Enviado: 25 julio 2022

Aceptado: 29 septiembre 2022

RESUMEN

Escherichia coli es una bacteria que está muy presente en nuestro día a día, como comensal o como forma patógena. Hay gran cantidad de cepas patógenas capaces de producir enfermedades, siendo de gran importancia para la salud pública aquellas cepas vehiculadas a través de los alimentos, provocando toxiinfecciones alimentarias con gran morbilidad. En algunos casos, las cepas que provocan estos brotes pueden ser muy patógenas ocasionando una gran mortalidad y con repercusiones muy graves para los afectados. En este estudio nos centramos en investigar la presencia de cepas vehiculadas a través de los alimentos de origen cárnico que formen parte de alguno de los 3 patotipos investigados (STEC, AIEC y EAEC). Por otro lado, planteamos investigar la resistencia a los antibióticos que presentan las cepas de *E. coli* aisladas en los alimentos cárnicos. Nuestros resultados han evidenciado la elevada resistencia fenotípica que presentan la gran mayoría de las cepas de *E. coli* aisladas en este estudio, planteando un grave problema para la salud pública. Esto hace necesario extremar las medidas de vigilancia y control de estos patotipos a lo largo de la cadena alimentaria. También es necesario ser cautos en el empleo de antibióticos ya que si se hace un uso inadecuado de los mismos provocaría un au-

mento en la dificultad terapéutica de las infecciones, amenazando con acabar con un siglo de avances médicos.

Palabras clave: *E. coli*, patotipos, resistencia antibiética y alimentos cárnicos

ABSTRACT

Escherichia coli is a bacteria that is very present in our daily life, as a commensal or pathogenic organism. There are a large number of pathogenic strains capable of producing diseases, being of great importance for public health those strains transmitted through food, causing foodborne infections with great morbidity. In some cases, the strains that cause these outbreaks can be highly pathogenic, causing high mortality and very serious health implications for those affected. In this study, we focused on investigating the presence of strains transmitted through food of meat origin that belong to one of the 3 pathotypes investigated (STEC, AIEC and EAEC). On the other hand, we proposed to investigate the antibiotic resistance of *E. coli* strains isolated from meat foods. Our results showed the high phenotypic resistance of the great majority of *E. coli* strains isolated in this study, posing a serious problem for public health. This makes it necessary to maximize vigilance and control measures for these pathotypes throughout the food chain. It is also necessary to be cautious in the use of antibiotics, since their inappropriate use would lead to an increase in the therapeutic difficulty of infections, threatening to put an end to a century of medical advances.

Key words: *E. coli*, pathotype, antibiotic resistance and carnic food

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli (*E. coli*) es una bacteria habitual del intestino delgado y grueso de todos los mamíferos, fue descubierta por primera vez en 1885 por un pediatra alemán, Theodore von Escherich. Este pediatra, que le dió el nombre de *Bacterium coli commune*. La bacteria es excretada por las heces, pudiendo sobrevivir en ellas durante semanas o meses (Moral et al., 2011; Markey, 2013).

E. coli pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, localizada en el filo *Proteobacteria*. Es una bacteria Gram negativa con forma de bacilo capaz de fermentar la lactosa y la glucosa con formación de gas y no emplea el citrato como forma de carbono (Lukjancenko et al., 2010; Canet, 2022).

E. coli encuentra su temperatura óptima de crecimiento entre 37-43 grados, la temperatura ideal de los animales de sangre caliente. El límite inferior de temperatura es 7 grados, por ello es fundamental mantener el frío en el procesado del producto alimentario para evitar el crecimiento de *E. coli*. La congelación no afecta sensiblemente a esta bacteria (Canet, 2022).

E. coli está relacionado con múltiples enfermedades, los 3 síntomas generales producidos por cepas de *E. coli* patogénicas son: infecciones del tracto urinario, sepsis/meningitis e infecciones del tracto digestivo/diarrea (Nataro et Kaper, 1998). Las cepas que producen infecciones del tracto digestivo reciben el nombre de “*E. coli* diarreogénicos”, agrupándolos en función de sus características de virulencia en distintos patotipos (Gomes et al., 2016). Por otro lado, están los *E. coli* patogénicos extra-intestinales, responsables de causar infecciones fuera del tracto digestivo como infecciones del tracto urinario (siendo en el ganado porcino una fuente frecuente de muertes en los individuos adultos), meningitis neonatal, mamitis en el ganado bovino y salpingitis en aves. Demostrando tener una gran capacidad de colonización (Bé-langer et al., 2011; Mellata, 2013).

En función de su capacidad de producción de toxinas, unión a las células, capacidad invasiva o cuadro clínico, se han descrito 6 patotipos principales de *E. coli* que suelen estar relacionados con la emisión por parte de las autoridades sanitarias de alarmas sanitarias. Estos tipos son: *E. coli* enteropatogénico (EPEC), *E. coli* shigatoxi-

génico (STEC), *E. coli* enteroinvasivo (EIEC), *E. coli* enteroagregativo (EAEC), *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) y *E. coli* adherente-invasivo (AIEC) (Yang et al., 2017).

El patotipo Shigatoxigénico se caracteriza por la producción extracelular de una o más tipos de toxinas muy similares o idénticas a las producidas por *Shigella spp.* Se distinguen dos tipos de toxinas: Stx1 y Stx2. Stx1 es idéntica a la producida por *Shigella spp.* en cambio Stx2 es única de *E. coli*. Estas toxinas están codificadas por un operón que contiene mínimo el gen *stxA*, el gen *stxB* y un promotor (Allen et al., 2015). Estas toxinas son las que producen las lesiones típicas de este patotipo, como son la colitis hemorrágica (HC) y el síndrome urémico hemolítico (HUS). La fisiopatología de este último se debe a la inhibición de la síntesis proteica de los eritrocitos y de las células endoteliales renales. Por otro lado, presentan una intimina que les permite adherirse a los enterocitos y colonizar la mucosa intestinal. Esta adhesina ha demostrado tener un papel fundamental en la persistencia y patogénesis en varias especies. Esta intimina está codificada por el gene *eae* (Nataro et Kaper, 1998; Vlisidou et al., 2006)

El patotipo enteroagregativo suele producir alarmas sanitarias en brotes alimentarios, al igual que STEC. Por ello, su control en salud pública es fundamental. Su fisiopatología se basa en la capacidad de adherencia mediante fimbrias, la secreción de enterotoxinas y citotoxinas que inducen un estado inflamatorio y el aumento de la producción de moco produciendo un extenso biofilm que cubre la superficie de los enterocitos (Jenkins, 2018). Habitualmente se emplea el gen *aaiC* para la detección de este tipo de patotipo por métodos moleculares (Hebbelstrup et al., 2017).

Las cepas de *E. coli* adherente-invasivo se caracterizan por su habilidad para adherirse e invadir mediante macropinocitosis los enterocitos, también son capaces de sobrevivir y replicarse en el interior de los macrófagos. Una vez en el interior de las células lisan la vacuola de endocitosis y comienzan su replicación. Este proceso

se produce masivamente en el interior de los macrófagos sin producir lisis celular, en consecuencia, se produce la liberación masiva de TNF α . Promoviendo un estado inflamatorio intestinal persistente. Estas cepas son capaces de migrar a capas más profundas de la barrera digestiva y activar continuamente los macrófagos. Pudiendo producir enfermedades inflamatorias como la enfermedad de Crohn (Darfeuille-Michaud, 2002).

El gen *GipA* presente en las cepas de AIEC se activa cuando la bacteria se encuentra en el interior del macrófago, se induce por el estrés oxidativo y el pH ácido del interior de la vacuola fagocitaria, permitiendo la supervivencia y replicación de la bacteria en el interior del macrófago, ya que induce un estado de resistencia al medio del interior de la vacuola fagocitaria (Emilie Vazeille et al., 2016). Por otro lado, posee una fimbria larga polar (LPF) que permite la aproximación a los macrófagos (Pires et al., 2015).

Para la OMS la resistencia a los antibióticos es una de las tres mayores amenazas de salud pública del siglo 21 (World Health Organization, 2014). Produciéndose más de 700.000 muertes al año en el mundo debido a bacterias resistentes, se estima que en los próximos 25 años se podrían producir 10 millones de muertes y pérdidas económicas de 100 billones de dólares para 2050. Por ello es una gravísima amenaza para la salud pública que debe enfocarse desde el enfoque de “Una sola salud”. La doctora Pilar Ramón Pardo, coordinadora del programa especial para la lucha con la resistencia antimicrobiana de la OPS/OMS, afirma que este problema amenaza con acabar con un siglo de avances médicos (Organización panamericana de salud, 2021).

Se describe este proceso cuando un organismo deja de ser susceptible a un antibiótico al que previamente era sensible. Este proceso se produce de forma natural, cuando se somete a las bacterias a la presencia de un antibiótico. Las bacterias tienen dos herramientas para adaptarse a la presencia de antibióticos: mutaciones genéticas o el intercambio de material genético. Estas modificaciones del material genético se pueden traducir en: una disminución del receptor para el

fármaco, una disminución de la permeabilidad al fármaco, la aparición de bombas que expulsan el antibiótico al medio o cambios en sus vías metabólicas (Munita et al., 2016).

La resistencia a los β -lactámicos puede estar mediada por distintos mecanismos: modificación de la proteína PBP (receptor de los β -lactámicos), modificación de las porinas de los canales de paso, la secreción activa mediante bombas (capaces de expulsar gran cantidad de fármacos aportando multiresistencias) y por último las β -lactamasas que hidrolizan los β -lactámicos. Siendo el último la forma principal de resistencia en los gram-negativos (Papp-Wallace et al., 2011).

En *E. coli* el gen *bla*_{TEM-1} codifica unas β -lactamasas que hidrolizan muy pocos β -lactámicos. (Nagy y Fekete, 1999). Otra de las enzimas más importantes es la *carbapenemasa* KPC, siendo identificada en gran parte de las enterobacterias con predominio de *Klebsiella pneumoniae*. Aunque un estudio indica que la enzima KPC por sí sola no es capaz de producir un nivel de resistencia aceptable. Las *carbapenemasas* con KPC como enzima, junto con la combinación de otros mecanismos sí que otorga niveles elevados de resistencia, siendo un grave problema para la salud pública. La enzima KPC se encuentra codificada por el gen *bla*_{KPC} (Vera-Leiva et al., 2017).

También cabe destacar la existencia de las enzimas NDM e IMP, codificadas por los genes *bla*_{NDM} y *bla*_{IMP}. La *carbapenemasa* NDM parece aportar niveles elevados de resistencia, al ser aisladas en varias bacterias multiresistentes. Se ha encontrado en las cepas que presentan el gen *bla*_{IMP} que la síntesis de la carbapenemasa IMP se ve muy favorecida en el momento que comienza la maduración del biofilm estando relacionadas la hiperactivación del gen *bla*_{IMP} con la colonización exitosa por parte de la bacteria (Zhang et al., 2018; Rehman et al., 2020)

La transferencia horizontal de estos genes a través de los transposones, los integrones y la inserción de secuencias a partir de enterobacte-

rias presentes en el suelo o en el agua a enterobacterias presentes en personas y/o animales juegan un papel fundamental en la prevalencia de las β -lactamasas (Wellington et al., 2013).

Las polimixinas deben unirse a los LPS de la membrana para producir su efecto bactericida. Por ello las resistencias más habituales se producen por modificaciones del lípido A del LPS. Estas modificaciones se producen por la adición de 4-amino-L-arabinosa, fosfoetanolamina y/o galactosamina; destacando que en *E. coli* la primera de todas es la que produce mayor resistencia y que la segunda está mediada por los genes *mcr-1*. El gen *mcr-2* ha sido aislado recientemente en cerdos belgas pero no suele encontrarse habitualmente. El gen *mcr-2* comparte un 77% de sus nucleótidos con el gen *mcr-1*, son casi idénticos. Se han identificado gran cantidad de variantes del gen *mcr* (desde *mcr-1* hasta *mcr-9*). Al igual que el gen *mcr-1*, el gen *mcr-9* ha demostrado tener una distribución mundial. Es importante mencionar que el gen *mcr-3* es idéntico en el 45 y 47% de sus nucleótidos a los genes *mcr-1* y *mcr-2* (Moffatt et al., 2019; Ling et al., 2020).

Estas modificaciones reducen la carga negativa de la membrana, reduciendo la afinidad con el grupo catiónico de la polimixina y haciendo menos susceptible la inserción de la misma (Khondker et Rheinstädter, 2020).

Los patógenos más asociados a toxiinfecciones alimentarias son *Campylobacter spp*, *Salmonella spp*, *Yersinia spp*, *E. coli*, *Listeria spp* y *Clostridium perfringens* (EFSA, 2020). Siendo los brotes alimentarios causados por bacterias un problema para la salud pública mundial muy extendido (Addis et Sisay, 2015). Muchos vertebrados son reservorios habituales de patógenos transmitidos por los alimentos (Carrique-Mas et Bryant, 2013).

No podemos pasar por alto el papel de los rumiantes (fundamentalmente el bovino) como reservorio principal de STEC, eliminando a través de sus heces serotipos muy variados. Estas materias fecales pueden contaminar partes de

la canal en el matadero, pueden usarse como abono para cultivos generando vegetales contaminados, puede llegar a fuentes de agua contaminando los cultivos irrigados o infectando directamente a los humanos. Por todo ello los principales alimentos relacionados en brotes de *E. coli* son el agua, los vegetales y la carne picada consumida poco cocinada (Mora et al., 2011). Se puede relacionar una mayor prevalencia en zonas donde la densidad de ganado vacuno es mayor (Michael et al., 1999).

La transmisión de EPEC suele ser vía fecal oral, siendo los *E. coli* inespecíficos de hospedador los productores habituales de las toxoinfecciones alimentarias. (Nataro et Kaper, 1998). El patotipo STEC O157:H7 suele producir la mayoría de los brotes asociados con carne y vegetales (Watahiki et al., 2014). Además, también se encuentran brotes de O157:H7 ligados al riego de agua contaminada en campos de cultivo, produciendo verduras asociadas a brotes alimentarios (Doyle et al., 2008). La gran incidencia de los brotes alimentarios asociados a HC, HUS y diarrea hemorrágica asociadas a la transmisión alimentaria de STEC, junto con la gran capacidad de sobrevivir en ambientes muy desfavorables como a pH ácidos provocan una dosis infectiva muy baja (50 o 100 bacterias), haciendo que este patotipo tenga un gran interés en su control de cara a la salud pública (Jafari et al., 2012).

Muchos alimentos, en particular los productos obtenidos de las aves, han demostrado ser un reservorio potencial de ExPEC (Jørgensen et al., 2019).

Gran variedad de los genes encargados de desarrollar resistencia se encuentran localizados en los plásmidos y en estos plásmidos se podrían localizar genes de virulencia. Es importante destacar que existen varios estudios que indican una correlación positiva entre la resistencia a antibióticos y la virulencia, al menos en algunas cepas. En algunos casos la evidencia ha demostrado en cepas aisladas de infecciones de tracto urinario la relación in-

versa entre la virulencia y la sensibilidad a las quinolonas (Da Silva et Mendonça, 2012).

En animales de granja varía en función de la especie, la virulencia y la resistencia de los *E. coli* aislados, por ejemplo, en porcino y aves se aprecia un nivel mayor de resistencia a los antibióticos y se aíslan mayor cantidad de genes de resistencia que en bovino (Ewers et al., 2009).

De todas formas, se está produciendo la difusión de cepas que combinan resistencia a antimicrobianos y la virulencia, como pueden ser las cepas de *E. coli* ST13 (Da Silva et Mendonça, 2012).

El principal objetivo global planetado en este estudio es identificar la presencia de *E. coli* en 27 muestras cárnicas. Como objetivos específicos, se planetan los siguientes: (1) determinar los genes de virulencia asociados a los patotipos shitotoxigénicos (STEC), enteroagregativos (EAEC) y adherente-invasivo (AIEC) en las cepas de *E. coli* aisladas, (2) evaluar mediante antibiogramas el perfil fenotípico de resistencia antibiótica de las cepas aisladas, (3) estudio del perfil genómico de las cepas aisladas en relación a la presencia de genes asociados a carbapenemasas o genes de resistencia a la colistina por métodos moleculares (PCR).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Tipo de muestras

Se emplearon un total de 27 muestras, todas ellas son alimentos cárnicos adquiridos en establecimientos alimentarios de la Región de Murcia, procedentes de un proyecto OTRI entre la CARM y la Universidad de Murcia, en relación a la vigilancia y control de patógenos emergentes y reemergentes. Los alimentos cárnicos fueron los siguientes: 7 salchichas, 2 pinchos morunos, 6 hamburguesas de ternera, 1 alitas marinadas, 4 longanizas, 1 hamburguesa de pavo, 1 hamburguesa de pollo, 1 hamburguesa de cerdo, 1 pollo adobado y 2 filetes adobados de cerdo.

Las muestras se conservaron en refrigeración a 4°C, en la Unidad Docente de Microbiología e Inmunología del Departamento de Sanidad Animal, de la Facultad de Veterinaria en la Universidad de Murcia, hasta su posterior procesado.

2. Aislamiento por métodos culturales de *Escherichia coli*

Para el aislamiento y cultivo microbiológico de *E. coli* se siguió la metodología descrita por Mora *et al.*, (2011).

2.1. Fase de pre-enriquecimiento y enriquecimiento

Para la fase de pre-enriquecimiento se realizaron diluciones 1/10 en agua de peptona (Tryptone Condalab) con cada una de las muestras (25g + 225 ml de agua de peptona tamponada) que fueron homogenizadas utilizando un homogeneizador (Masticator Classic.IUL. España).

Posteriormente, el material homogeneizado fue filtrado y recogido en un recipiente de vidrio estéril, en los que se incubaron las muestras a 37°C durante 6-7 horas.

A continuación, se realizó una fase de enriquecimiento en el caldo Mossel EE broth (Scharlau) a dilución 1/10 y dichos caldos fueron incubados a 37°C durante 18-24 horas.

2.2. Aislamiento de *E. coli* en medios selectivos

Para el aislamiento de esta bacteria se utilizaron 3 medios diferenciales y selectivos distintos y específicos de *E. coli*. Estos medios fueron: Agar Lactosa-MacConkey (MCK) (Scharlab, España), Agar TBX (TBX) (Scharlab, España) y Agar Cefixime tellurite sorbitol-MacConkey (CT) (Scharlab, España).

A partir de los caldos de la fase de enriquecimiento, se realizó una siembra en superficie por agotamiento en los medios diferenciales mencionados anteriormente.

En el medio agar TBX se cultivan por duplicado, la mitad de las placas fueron incubadas

a 37°C durante 18-24 horas y la otra mitad a 44°C, temperatura que inhibe la mayor parte de los *E. coli*, pero permite el crecimiento de coliformes fecales y la selección de los STEC O157 (Mora *et al.*, 2012).

3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Técnica de biología molecular empleada para la detección específica de un fragmento de ADN. Este proceso se basa en una serie de reacciones cíclicas producidas sobre una región del ADN delimitada por 2 cebadores o primers. Necesita utilizar una enzima polimerasa que se encarga de replicar la secuencia delimitada entre estos dos primers. Cada ciclo de amplificación requiere de los siguientes pasos: desnaturalización de la doble hélice de ADN, acoplamiento de los primers y elongación de la hebra. Produciéndose cada uno de estos pasos a distintas temperaturas y tiempos (Ramesh *et al.*, 1992).

Todas las PCRs realizadas en este trabajo se prepararon en el interior de una cabina de PCR aislada del exterior, para evitar contaminaciones externas (Modelo DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T Lam Technics), durante la preparación siempre se usaron guantes de nitrilo desechables, micropipetas de uso exclusivo para realizar la preparación de las PCRs, puntas con filtro y tubos de 0,2ml específicos de PCRs.

Los ciclos de amplificación se realizaron en el LifeECO Thermal Cycler (Bioer Technology), aplicando el sistema de ciclos indicados en la tabla 1.

3.1. Visualización de los productos de la PCR

Una vez realizadas las PCRs, los productos amplificados se corrieron sobre un gel de agarosa (Pronadisa Laboratorios CONDA. España) al 1,5% teñido con Midori Green (Nippon Genetics), para ello se utiliza una cubeta de electroforesis horizontal (Modelo DN-CN-BN, LABOLAN S.L.). Finalmente, para la visualización de los fragmentos amplificados se emplea

Tabla 1. Fases de una PCR con las características de T^a, tiempo y ciclo de cada una.

FASE	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización inicial	95°C	3 minutos	1
Desnaturalización	95°C	15 segundos	35 ciclos
Acoplamiento	60°C	15 segundos	
Elongación	72°C	15 segundos	
Extensión final	72°C	1 minuto	1 ciclo

un transiluminador (FastGene® Blue/Green LED Transilluminador, Nippon Europe Genetics).

4. Detección de *E. coli* por métodos moleculares

Como el uso de medios selectivos y diferenciales puede provocar un aislamiento inexacto de las bacterias cultivadas en ellos, se emplearon métodos moleculares en aquellas colonias que cumplieron los requisitos de crecimiento de *E. coli*.

4.1. Extracción del ADN

Se seleccionaron las colonias crecidas en el agar TBX e incubadas a 37°C. Se realizó una suspensión de al menos 10 colonias bacterianas en 200µl de agua destilada. A continuación, las muestras fueron tratadas a 100°C durante 10 minutos en un bloque térmico en agitación constante, para producir la lisis de las bacterias y la liberación del ADN.

4.2. PCR para identificación de *E. coli*

Para la detección de cualquier cepa de *E. coli* se emplearon los primers Ec1 y Ec2, a una concentración de 0,5 µM, específicos para el gen diana *uspA* de *E. coli* (Osek, 2001).

Para cada reacción se utilizó un volumen final de 20 microlitros (µl), el kit NXT Taq PCR EURx®, el cual contiene el buffer con la Taq

DNA Polymerase, MgCl₂ y los dNTPs, al que se adicionaron los primers Ec1 y Ec2 y 2µl de la muestra extraída de ADN a amplificar. Como control negativo, se utilizaron 2 µl de agua destilada estéril y como control positivo 2µl de ADN extraído de la cepa O157:H7, CECT 4783.

Todas estas reacciones se realizaron y visualizaron siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.3.

5. Detección de los patotipos STEC, EAEC y AIEC

5.1. Aislamiento de las colonias de *E. coli*

Una vez confirmada mediante métodos moleculares la presencia de *E. coli*, pasamos a seleccionar cuidadosamente 5 colonias individuales de la placa de TBX (incubada a 37°C) por muestra. Cada colonia fue sembrada de nuevo en Agar Mackonkey para posteriormente sembrarlas en Agar triptosa (Condalab Tryptose agar) inclinado.

5.2. Detección de genes asociados a los patotipos STEC, EAEC y AIEC por métodos moleculares (PCR)

Con el ADN de las 5 colonias de *E. coli* aisladas de cada una de las muestras de nuestro estudio se realiza la detección molecular por

Tabla 2. Genes en estudio para cada patotipo y sus primers.

PATOTIPO	GENES	PRIMERS	SECUENCIA DE OLIGONUCLEOTIDOS (5'-3')	Tamaño del fragmento (pb)	REFERENCIA
STEC	<i>Stx1</i>	VT1-F VT1-R	TCGCTGAATGTCATTTCGCTCTGC TCAGCAGTCATTACATAAGAAC	539	Mora y col., 2011
	<i>Stx2</i>	VT2-F1 VT2-F2 VT2-R	TTTCTTCGGTATCCTATTCCC TGTCTTCAGCATCTTATGCAG CTGCTGTCCGTTGTCAITGGAA	358	Mora y col., 2011
	<i>eae</i>	EAE-V3F EAE-MBR	CATTGATCAGGATTTTTCTGGT TCCAGAATAATATTGTTATTACG	510	Mora y col., 2011
EAEC	<i>aaiC</i>	aaiC-F aaiC-R	TGGTGACTACTTTGATGGACATTGT GACACTCTCTTCTGGGGTAAACGA	313	Boisen y col., 2012
AIEC	<i>GipA</i>	gipA-1 gipA-2	CAAAACCGACAATCCCCGC GCCGATTGCCGGATGGACAA	450	Vanelle y col., 2016
	<i>lpfA</i>	lpfA-1 lpfA-2	GGCCTTCTTTCAGACGGTA CTGGAAAAC TGCGATATCTCC	750	Chasaing y col. 2011

PCR de los genes más significativos de los patotipos STEC, EAEC y AIEC. Los genes dianas seleccionados y los primers empleados en cada una de las PCRs se recogen en la tabla 2.

El volumen final de cada reacción fue de 20 µl, se empleó el kit NXT Taq PCR EURx®, el cual contiene el buffer con la Taq DNA Polymerase, MgCl₂ y los dNTPs, los primers (Tabla 2) y 2 microlitros de la muestra de ADN a amplificar. Como control negativo, se utilizaron 2 µl de agua destilada estéril y como control positivo del patotipo STEC se emplearon 2µl el ADN extraído de la cepa O157:H7, CECT 4783, para el patotipo EAEC 2µl de ADN extraído de la cepa O44:H18, CECT 737, para el gen *aaiC* el ADN extraído de la cepa O104:H4, cedida por el Dr. Lucas Domínguez (Lab. VISAVET.UCM. Madrid) y para el control positivo del patotipo AIEC 2µl de ADN extraído de la cepa LF82 cedida por el Dr. Barnich (INRA. Universidad De Avignon. Francia).

6. Estudio de la resistencia antimicrobiana de los *E. coli* aislados

6.1. Detección fenotípica de la resistencia antimicrobiana (Antibiograma)

Para el estudio fenotípico de resistencia antimicrobiana de las cepas de *E. coli* previamente identificadas y aisladas, se empleó el método de la difusión en gel o método de Kirby-Bauer (Bauer et al., 1966), también conocido como antibiograma. Para su realización se sembró en sábana una suspensión del cultivo puro en 100µl de solución salina, con una turbidez ajustada a un patrón 0,5 de la escala de McFarland, equivalente a 1.5x10⁸ UFC/mL (Mc Farland, 1907), en placa de Petri con Agar Müller-Hinton (Pronadisa. España). Posteriormente, se colocaron 7 discos de los antibióticos (colistina, amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina, polimixina b, gentamicina, tetraciclina y ciprofloxacino) (tabla 3) con concentración

Tabla 3. Interpretación de los halos generados por los discos de antibióticos.

Antibiótico	Diámetro de los halos (mm): Susceptible	Diámetro de los halos (mm): Resistente	Referencia
Ciprofloxacino	+25mm	-22mm	EUCAST
Amoxicilina- ac. Clavulánico	+19mm	-19mm	
Ampicilina	+14mm	-14mm	
Gentamicina	+17mm	-17mm	
Tetraciclina	+19mm	-14mm	
Colistina	+17mm	-11mm	Bryan et al., (2013).
Polimixina B	+19mm	-13mm	CLSI (2020).

Tabla 4: Información sobre los primers empleados para la detección de resistencia antimicrobiana por PCR.

GENES	PRIMERS	SECUENCIA OLIGONUCLEOTIDOS (5'-3')	DE	Tamaño del fragmento (pb)	REFERENCIA
<i>bla</i> _{KPC}	Kpc-F Kpc-R	AAC AAG GAA TAT CGT TGA TG AGA TGA TTT TCA GAG CCT TA		916	Sacsquispe-Contreras et et Bailón-Calderón, 2018
<i>bla</i> _{IMP}	IMP-F IMP-R	GGAATAGAGTGGCTTAAAYTCTC GGTTTAAAYAAAACAACCACC		232	Poirel et al., 2010
<i>bla</i> _{NDM}	NDM-F NDM-R	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC CGGAATGGCTCATCACGATC		621	Poirel et al., 2010
<i>mcr-1</i>	CLR5-F CLR5-R	CGGTCAGTCCGTTTGTTC CTTGGTCGGTCTGTGA GGG		400	Liu et al., 2016

conocida (Bio-Rad Laboratories). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Para su interpretación se midieron los halos de inhibición generados alrededor de los discos de antibióticos. Clasificando las muestras en sensibles, intermedias y resistentes (tabla 3).

6.2. Detección de genes asociados a carbapenemasas y de resistencia a la colistina por métodos moleculares (PCR)

Para la detección en las cepas aisladas de *E. coli*, de genes asociados a carbapenemasas y genes de resistencia a la colistina se realizaron

distintas PCRs. Para el estudio de resistencia frente a carbapenemasas se emplearon como genes diana los genes: *bla*_{NDM} (Rehman et al., 2020), *bla*_{KPC} (Vera-Leiva et al., 2017) y *bla*_{IMP} (Zhang et al., 2018). Para el estudio de la resistencia frente a la colistina se empleó como gen diana el gen *mcr-1* (Zhang et al., 2018). La información relativa a los primers utilizados viene recogida en la tabla 4.

Para cada reacción se utilizó un volumen final de 20 microlitros (µl), el kit NXT Taq PCR EURx®, el cual contiene el buffer con la Taq DNA Polymerase, MgCl₂ y los dNTPs, al que se adicionaron los primers indicados en la tabla

Tabla 5: Prevalencia detectadas en los genes asociados a los patotipos STEC, EAEC y AIEC.

	<i>Stx1</i>	<i>Stx2</i>	<i>eae</i>	<i>GipA</i>	<i>lpf</i>	<i>aaiC</i>
N.º de Colonias a investigar	70	70	70	46	80	8
N.º de Colonias POSITIVAS	1	1	21	3	19	1
Prevalencia	1%	1%	30%	7%	24%	13%

4 y 2 microlitros de la muestra extraída de ADN a amplificar. Como control negativo, se utilizaron 2 µl de agua destilada estéril y como control positivo 2µl de ADN extraído de la cepa cedida por la Dr. Mora del laboratorio de referencia de *E. coli*, siendo las cepas para *mcr-1* de origen animal y las cepas de *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{IMP}* de origen humano.

Todas estas reacciones se realizaron y visualizaron siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.3.

RESULTADOS

1. Resultados obtenidos del estudio de patotipos

Realizamos el estudio de los patotipos STEC, EAEC y AIEC en cada muestra cárnica. Para hacer un cribado inicial, se realizó una primera detección de genes asociados a patotipos con un pool de ADN extraído de todas las colonias de cada muestra.

Para el estudio del patotipo STEC, 16 muestras dieron positivo mediante técnicas moleculares (PCR) al gen *stx1*, *stx2* y/o *eae*. Pero en ninguna muestra se detectó la combinación de los tres genes de manera simultánea. Cuando se repitió el estudio en las colonias aisladas de estas 16 muestras, siendo un total de 70 colonias, se identificaron ya de forma individualizada dos colonias positivas al gen *stx1*, una colonia positiva al gen *stx2* y 21 colonias positivas al gen *eae*.

Para el estudio del patotipo AIEC, 10 muestras dieron positivo mediante técnicas moleculares

(PCR) al gen *Gip A*. Por ello, se realizó la PCR a las 46 colonias aisladas de esas 10 muestras, siendo solo 3 colonias positivas en PCR al gen *Gip A*. Sin embargo, para el otro gen asociado a este patotipo 18 muestras dieron positivo mediante técnicas moleculares (PCR) al gen *lpf*, por lo que se realizó la PCR a las 80 colonias aisladas de esas 18 muestras dando 19 colonias positivas a este gen.

Para el estudio del patotipo EAEC, Solo 2 muestras dieron positivo mediante técnicas moleculares (PCR) al gen *aaiC*. Se realizó la PCR a las 8 colonias aisladas de esas 2 muestras, dando solo 1 positiva.

Como se puede observar, en la tabla 5, el mayor porcentaje de muestras positivas se encuentran en los genes *eae* y *lpf*. El primero pertenece al grupo de genes típico de las cepas STEC y el segundo es típico del grupo de genes de las cepas AIEC.

2. Resultados del estudio fenotípico y genómico de resistencia antimicrobiana

En los 27 alimentos cárnicos investigados, tras el aislamiento en distintos medios de cultivo, se escogió al azar una de las cepas aisladas de cada muestra para realizar el estudio fenotípico de la resistencia antimicrobiana. Por tanto, se realizaron 27 antibiogramas siguiendo la metodología descrita en materiales y métodos. Reflejando los resultados en la tabla 6.

En la tabla 7 se refleja el porcentaje de muestras sensibles, resistentes o de sensibilidad intermedia en función del antibiótico empleado.

Tabla 6. Resultados de los halos de inhibición (en cm) de los antibiogramas.

N.º de referencia	Cs ϕ	Pxb ϕ	Cn ϕ	Te ϕ	Amc ϕ	Amp ϕ	Cip ϕ
4.1	0,9	1,3	1,8	0,6	0,6	0,6	3,4
7.1	1,1	1,3	2	0,6	0,6	0,6	1,4
32.1	1,1	1,3	1,8	2	1	1,2	3,8
12,3	1,1	1,3	1,8	2,4	0,6	0,6	3,4
23,1	1,1	1,3	2,4	1,2	0,6	0,6	2,8
93.1	0,9	1,3	1,8	0,6	0,6	0,6	3,4
71.3	0,9	1,5	1,6	1,6	1	0,6	3
1.1	1,1	1,5	2	0,6	0,6	0,6	3,4
3.1	1,1	1,3	1,8	2	0,6	1,4	3,4
5.1	1,1	1,5	1,8	1,8	0,6	1,4	3
7.1	1,1	1,3	2	2	0,6	0,6	2,6
8.1	1,1	1,3	1,8	0,6	0,6	0,6	1,2
9.1	1,1	1,3	1,8	0,6	0,6	0,6	1
11.3	0,9	1,3	1,8	1	0,6	1,4	3,2
12.1	0,9	1,3	1,8	0,6	0,6	0,6	3,8
13.3	1,1	1,1	0,6	0,6	0,6	0,6	2,8
16.5	1,1	1,3	2	2,2	0,6	1	3,8
17.1	1,1	1,3	2,4	2	0,6	0,6	4,4
19.4	0,9	1,3	1,4	0,6	0,6	0,6	3
20.3	1,1	1,1	0,6	0,6	0,6	0,6	1
15.3	1,1	1,5	2	0,6	1	1,4	3,4
14.1	1,3	1,3	2,4	0,6	0,6	0,6	1,4
27.5	1,3	1,5	2,2	1,4	1	1,6	3,4
29.5	1,3	1,3	2	1,4	0,8	1,2	3,4
30.5	0,9	1,1	1,8	0,6	0,6	1,2	2,8
32.1	1,1	1,5	2	2	0,6	0,6	3,4
33.3	1,1	1,1	2	0,6	0,6	0,6	1,8

En verde las bacterias sensibles, en rojo las bacterias resistentes y en azul las que tienen sensibilidad intermedia.

Tabla 7. Porcentaje de muestras en función de la sensibilidad a los antibióticos

	CS	PXB	CN	TE	AMC	AMP	CIP
Resistente	89%	78%	15%	67%	100%	81%	22%
Intermedio	11%	22%	0%	7%	0%	0%	0%
Sensible	0%	0%	85%	26%	0%	19%	78%

CS: colistina. PXB: polimixina b. CN: gentamicina. TE: tetraciclina. AMC: amoxicilina-ácido clavulánico. AMP: ampicilina. CIP: ciprofloxacino.

Los resultados mostraron un bajo número de muestras sensibles a la colistina, polimixina b, amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina y a las tetraciclinas. Mientras que los resultados de los antibiogramas para el ciprofloxacino y la gentamicina mostraron un número más elevado de sensibilidad de las cepas investigadas, a estos antibióticos.

Los resultados obtenidos en el estudio de estas resistencias a nivel fenotípico, no se corresponden con los obtenidos por métodos moleculares para detectar genes de resistencia. Así, no se detectaron genes asociados a la presencia de carbapenemasas o de resistencia a la colistina en las diferentes cepas aisladas en los productos alimentarios investigados. Esto puede deberse a que existen mecanismos muy variados de resistencia, desde la presencia de otros genes no estudiados, hasta la producción de biofilms. Por ello, el que no detectemos alguno de los 4 genes estudiados no quiere decir que no presente otros genes u otros mecanismos de resistencia no estudiados.

Relacionando los resultados de los antibiogramas con las especies de abasto estudiadas, podemos constatar que las cepas provenientes de las muestras de vacuno muestran una menor sensibilidad que el resto de especies a la gentamicina, esto significa que el 33% de las muestras de vacuno son resistentes a este antibiótico, frente al 0% de las de pollo y al 12% de las de porcino.

Las cepas aisladas de las muestras de cerdo, muestran mayor resistencia a la ampicilina que

las de otras especies, el 94% de las muestras de porcino eran resistentes a la ampicilina frente al 67% de las muestras de pollo y al 50% de las muestras de vacuno. Finalmente destacar el elevado grado de resistencia frente al ciprofloxacino de las muestras de pollo, donde el 67% de las muestras eran resistentes al ciprofloxacino frente al 18% de las muestras de porcino y al 17% de las muestras de vacuno.

DISCUSIÓN

Comparando nuestros resultados de resistencia genotípica y fenotípica con los publicados por Pormohammad et al., (2019), donde hace una revisión bibliográfica de varios estudios de distintos países de la resistencia a los antibióticos en *E. coli*, clasificando las muestras según su origen (humano, animal y alimento/ambiente). En este estudio las prevalencias de resistencias en las muestras de alimentos/ambiente fueron de: 3,2% para la colistina, 14,4% para el ciprofloxacino, 4,8% para la amoxicilina-ácido clavulánico, 47% en la tetraciclina, 9% en la gentamicina y un 40,2% en la ampicilina. Si comparamos estas prevalencias con los resultados de nuestro estudio, observamos que, en nuestro estudio, en la colistina y la amoxicilina-ácido clavulánico se observaron prevalencias mucho mayores. Por otro lado, nuestro estudio mostró porcentajes muy superiores de resistencia frente a la tetraciclina o a la ampicilina, mientras que los resultados obtenidos para

la gentamicina y el ciprofloxacino son similares a la descrita en otros trabajos.

La elevada resistencia fenotípica de las cepas aisladas frente a la colistina y a la polimixina b junto con la muy baja prevalencia del gen *mcr-1*, obtenidas en este trabajo, no coincide con los resultados obtenidos por otros autores así, Irrgang et al., (2016) obtuvieron en muestras cárnicas de pollo prevalencias del 1% de resistencia a la colistina, de las cuales el 50% presentaban el gen *mcr-1*; la carne de pavo tuvo una prevalencia del 5.9% de resistencia a la colistina de las cuales el 90,9 % presentaban el gen *mcr-1*; en la carne de vacuno el 5,7% presentaba resistencia a la colistina de las cuales el 25% presentaba el gen *mcr-1*. Sin embargo, en la carne de porcino no se aislaron muestras resistentes a la colistina ni positivas al gen *mcr-1*.

Ambos β -lactámicos, mostraron niveles elevados de resistencia en los antibiogramas de las muestras analizadas, estas mostraron resistencia en la amoxicilina-ácido clavulánico. En un estudio (Luo et al., 2018) realizado en 2993 cepas de *E. coli* provenientes de pacientes enfermos

humanos, solo 24 cepas mostraron resistencia a los β -lactámicos. Los autores realizaron la búsqueda de genes de resistencia a los β -lactámicos y detectaron 4 cepas positivas al gen *bla_{IMP}*, 2 cepas positivas al gen *bla_{KPC}* y 1 cepa positiva al gen *bla_{NDM}*. Estos resultados coinciden parcialmente con los nuestros. En nuestro estudio, la prevalencia de la resistencia fenotípica a los β -lactámicos es muy elevada si la comparamos con el trabajo de Luo et al. (2018), donde estas prevalencias son más bajas. En cambio, la prevalencia de resistencia genotípica a los genes indicados anteriormente obtenida por estos autores fue baja, coincidiendo con la prevalencia genotípica obtenida en nuestro estudio.

Comparando nuestros resultados con los datos de resistencias publicados por Liu et al., (2022) donde estudiaron 260 cepas de *E. coli* de origen fecal, nuestros resultados parecen coincidir con los autores, ya que, en nuestro estudio, de 27 cepas 25 presentan resistencia al menos a 3 de los 7 antibióticos testados por antibiograma (Figura 1), obteniendo una prevalencia del 92% de presencia de cepas multirresistentes. En

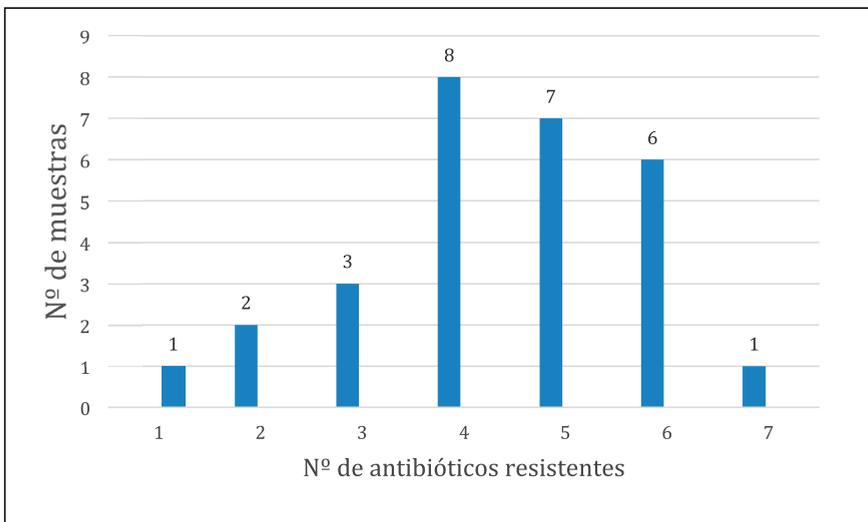


Figura 1. Número de muestras clasificadas en función a la cantidad de antibióticos resistentes en el antibiograma.

el estudio mencionado anteriormente se citan prevalencias del 84% de cepas resistentes en, al menos, 3 antibióticos de los 12 que emplearon los autores.

Liu et al. (2022) también calcularon la prevalencia de algunos genes de resistencia, entre ellos el bla_{NDM} , donde encontraron prevalencias muy bajas (3,1%) coincidiendo con nuestros resultados.

CONCLUSIONES

En las muestras analizadas, los genes con mayor presencia y asociados a los patotipos STEC, EAEC y AIEC fueron *eae* y *lpf*, relacionados con mecanismos de virulencia de adhesión/adhesión.

- 1) El estudio fenotípico, por antibiograma de resistencia antibiótica, mostró resistencia a varios antibióticos como a la colistina, polimixina b, amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina y a las tetraciclinas en los *E. coli* encontrados en los alimentos cárnicos muestreados. Siendo más prevalentes las resistencias al ciprofloxacino en la carne de ave, a la ampicilina en la carne de cerdo y a la gentamicina en la carne de vacuno.
- 2) El estudio genómico (por PCR), para la detección de genes de resistencia a los antibióticos investigados en este estudio, mostró una baja prevalencia de los genes frente a carbapénicos o colistina (genes bla_{NDM} , bla_{KPC} , bla_{IMP} , *mcr-1*) que no se correlacionó con la resistencia fenotípica encontrada en las muestras analizadas.
- 3) A la vista de la escasa correlación de resultados obtenidos entre el antibiograma (perfil fenotípico) y la detección de genes de resistencia a los antibióticos (perfil genómico) propuestos en el estudio, se requiere realizar futuros estudios adicionales con mayor número de muestras para contrastar y verificar estos resultados.

- 4) Los resultados obtenidos en el presente trabajo, si bien no implican un riesgo de producción de brotes alimentarios y/o emisión de alertas sanitarias, sí nos indican un posible riesgo potencial de los mismos, si se presentaran condiciones ambientales y de manejo favorables.
- 5) Finalmente, se hace necesario, por parte de la administración y profesionales de la inspección veterinaria, seguir desarrollando programas rutinarios de vigilancia sanitaria de alimentos como medida efectiva de prevención y control de las enfermedades emergentes y reemergentes, ocasionadas por microorganismos como es *E. coli* en alimentos de consumo público.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American journal of clinical pathology*, 45(4), 493–496.
2. Bélanger, L., Garenaux, A., Harel, J., Boulianne, M., Nadeau, E., & Dozois, C. M. (2011). *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS immunology and medical microbiology*, 62(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00797.x>
3. Bennett, J. E., Md, D. R., & Md, M. B. J. (2019). Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases: 2-Volume Set. En *Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance in Bacteria* (9th ed., pp. 235–251). Elsevier.
4. Bryan, A., Youngster, I., & McAdam, A. J. (2015). Shiga Toxin Producing *Escherichia coli*. *Clinics in laboratory medicine*, 35(2), 247–272. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.02.004>
5. Canet, Juan José [consultado 16 Mayo 2022]. *Escherichia Coli: características*,

- patogenicidad y prevención (I) .Betelgeux, Christeysn food higiene. Disponible en : <https://www.betelgeux.es/blog/2016/01/19/escherichia-coli-caracteristicas-patogenicidad-y-prevencion-i/#:~:text=de%20Escherichia%20coli.-,E.,lactosa%20con%20producci%C3%B3n%20de%20gas.>
6. Carrique-Mas, J. J., & Bryant, J. E. (2013). A review of foodborne bacterial and parasitic zoonoses in Vietnam. *EcoHealth*, 10(4), 465–489. <https://doi.org/10.1007/s10393-013-0884-9>
 7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2020). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and laboratory standards Institute.
 8. Courvalin P. (2008). Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance. *Journal of internal medicine*, 264(1), 4–16. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2008.01940.x>
 9. Da Silva, G. J., & Mendonça, N. (2012). Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. *Virulence*, 3(1), 18–28. <https://doi.org/10.4161/viru.3.1.18382>
 10. Darfeuille-Michaud A. (2002). Adherent-invasive *Escherichia coli*: a putative new *E. coli* pathotype associated with Crohn's disease. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 292(3-4), 185–193. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00201>
 11. Doyle, M. & Archer, John & Kaspar, Charles & Weiss, Ronald. (2011). Human Illness Caused by *E. coli* O157:H7 from Food and Non-food Sources.
 12. Duan, Q., Yao, F., & Zhu, G. (2011). Major virulence factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* in pigs. *Annals of Microbiology*, 62(1), 7–14. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0279-5>
 13. E.C.D.P.C. (2022). *Surveillance Atlas of Infectious Diseases*. European Centre for Disease Prevention and Control. Consultado 16 de mayo de 2022, de <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Dataset=27&HealthTopic=4>
 14. Ewers, C., Antão, E. M., Diehl, I., Philipp, H. C., & Wieler, L. H. (2009). Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. *Applied and environmental microbiology*, 75(1), 184–192. <https://doi.org/10.1128/AEM.01324-08>
 15. Frieri, M., Kumar, K., & Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *Journal of infection and public health*, 10(4), 369–378. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007>
 16. Gomes, T. A., Elias, W. P., Scaletsky, I. C., Guth, B. E., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M., Ferreira, L. C., & Martinez, M. B. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 47 Suppl 1(Suppl 1), 3–30. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>
 17. Hebbelstrup Jensen, B., Poulsen, A., Hebbelstrup Rye Rasmussen, S., Struve, C., Engberg, J. H., Friis-Møller, A., Boisen, N., Jønsson, R., Petersen, R. F., Petersen, A. M., & Krogfelt, K. A. (2017). Genetic Virulence Profile of Enteraggregative *Escherichia coli* Strains Isolated from Danish Children with Either Acute or Persistent Diarrhea. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 230. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00230>
 18. Irrgang, A., Roschanski, N., Tenhagen, B. A., Grobbel, M., Skladnikiewicz-Ziemer, T., Thomas, K., Roesler, U., & Käsböhrer, A. (2016). Prevalence of *mcr-1* in *E. coli* from Livestock and Food in Germany, 2010–2015. *PloS one*, 11(7), e0159863. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159863>
 19. Jafari, A., Aslani, M. M., & Bouzari, S. (2012). *Escherichia coli*: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. *Iranian journal of microbiology*, 4(3), 102–117.

20. Jenkins C. (2018). Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Current topics in microbiology and immunology*, 416, 27–50. https://doi.org/10.1007/82_2018_105
21. Jørgensen, S. L., Stegger, M., Kudirkiene, E., Lilje, B., Poulsen, L. L., Ronco, T., Pires Dos Santos, T., Kiil, K., Bisgaard, M., Pedersen, K., Nolan, L. K., Price, L. B., Olsen, R. H., Andersen, P. S., & Christensen, H. (2019). Diversity and Population Overlap between Avian and Human *Escherichia coli* Belonging to Sequence Type 95. *mSphere*, 4(1), e00333-18. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00333-18>
22. Khondker, A., & Rheinstädter, M. C. (2020). How do bacterial membranes resist polymyxin antibiotics?. *Communications biology*, 3(1), 77. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0803-x>
23. Ling, Z., Yin, W., Shen, Z., Wang, Y., Shen, J., & Walsh, T. R. (2020). Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 75(11), 3087–3095. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa205>
24. Liu, Z., Wang, K., Zhang, Y., Xia, L., Zhao, L., Guo, C., Liu, X., Qin, L., & Hao, Z. (2022). High Prevalence and Diversity Characteristics of *bla*NDM, *mcr*, and *bla*ESBLs Harboring Multidrug-Resistant *Escherichia coli* From Chicken, Pig, and Cattle in China. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 755545. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.755545>
25. Luo, Y., Luo, R., Ding, H., Ren, X., Luo, H., Zhang, Y., Ye, L., & Cui, S. (2018). Characterization of Carbapenem-Resistant *Escherichia coli* Isolates Through the Whole-Genome Sequencing Analysis. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 24(2), 175–180. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0079>
26. Machota, S. V., Durán, S. P., & Yanes, E. M. M. (2002). *Manual de Microbiología veterinaria*. McGraw-Hill Education.
27. Maravić G. (2004). Macrolide resistance based on the Erm-mediated rRNA methylation. Current drug targets. *Infectious disorders*, 4(3), 193–202. <https://doi.org/10.2174/1568005043340777>
28. Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A., & Maguire, D. (2013). *Clinical Veterinary Microbiology - Elsevieron VitalSource (English Edition)* (2.^a ed.). Mosby Ltd.
29. McFARLAND, J. (1907b). THE NEPHLOMETER: AN INSTRUMENT FOR ESTIMATING THE NUMBER OF BACTERIA IN SUSPENSIONS USED FOR CALCULATING THE OPSONIC INDEX AND FOR VACCINES. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, XLIX(14), 1176. <https://doi.org/10.1001/jama.1907.25320140022001f>
30. Mellata M. (2013). Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. *Foodborne pathogens and disease*, 10(11), 916–932. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1533>
31. Michel, P., Wilson, J. B., Martin, S. W., Clarke, R. C., McEwen, S. A., & Gyles, C. L. (1999). Temporal and geographical distributions of reported cases of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Ontario. *Epidemiology and infection*, 122(2), 193–200. <https://doi.org/10.1017/s0950268899002083>
32. Moffatt, J. H., Harper, M., & Boyce, J. D. (2019). Mechanisms of Polymyxin Resistance. *Advances in experimental medicine and biology*, 1145, 55–71. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16373-0_5
33. Mora, A., Herrera, A., López, C., Dahbi, G., Mamani, R., Pita, J. M., Alonso, M. P., Llovo, J., Bernárdez, M. I., Blanco, J. E., Blanco, M., & Blanco, J. (2011). Characteristics of the Shiga-toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 14(3), 121–141. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.142>

34. Mora, A., López, C., Dhabi, G., López-Beceiro, A. M., Fidalgo, L. E., Díaz, E. A., Martínez-Carrasco, C., Mamani, R., Herrera, A., Blanco, J. E., Blanco, M., & Blanco, J. (2012). Seropathotypes, Phylogroups, Stx subtypes, and intimin types of wildlife-carried, shiga toxin-producing escherichia coli strains with the same characteristics as human-pathogenic isolates. *Applied and environmental microbiology*, 78(8), 2578–2585. <https://doi.org/10.1128/AEM.07520-11>
35. Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*, 4(2), 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
36. Nagy, B., & Fekete, P. Z. (1999). Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Veterinary research*, 30(2-3), 259–284.
37. Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 11(1), 142–201. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.1.142>
38. O.P.S. (2021, 3 marzo). *La resistencia antimicrobiana pone en riesgo la salud mundial*. OPS/OMS |Organización Panamericana de la Salud. Recuperado 15 de mayo de 2022, de <https://www.paho.org/es/noticias/3-3-2021-resistencia-antimicrobiana-pone-riesgo-salud-mundial#:~:text=M%20C%20A%20s%20de%20700%20mil%20muertes,p%20C%20A%20rdidas%20econ%20C%20B%20micas%20que%20superar%20C%20ADan%20los>
39. Orth, P., Schnappinger, D., Sum, P. E., Ellestad, G. A., Hillen, W., Saenger, W., & Hinrichs, W. (1999). Crystal structure of the tet repressor in complex with a novel tetracycline, 9-(N,N-dimethylglycylamido)-6-demethyl-6-deoxy-tetracycline. *Journal of molecular biology*, 285(2), 455–461. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2290>
40. Osek, J., & Dacko, J. (2001). Development of a PCR-based method for specific identification of genotypic markers of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, 48(10), 771–778. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2001.00508.x>
41. Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A., & Bonomo, R. A. (2011). Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(11), 4943–4960. <https://doi.org/10.1128/AAC.00296-11>
42. Pires, S. M., Fischer-Walker, C. L., Lanata, C. F., Devleeschauwer, B., Hall, A. J., Kirk, M. D., Duarte, A. S., Black, R. E., & Angulo, F. J. (2015). Aetiology-Specific Estimates of the Global and Regional Incidence and Mortality of Diarrhoeal Diseases Commonly Transmitted through Food. *PLoS one*, 10(12), e0142927. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142927>
43. Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 70(1), 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>
44. Pormohammad, A., Nasiri, M. J., & Azimi, T. (2019). Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains simultaneously isolated from humans, animals, food, and the environment: a systematic review and meta-analysis. *Infection and drug resistance*, 12, 1181–1197. <https://doi.org/10.2147/IDR.S201324>
45. Ramesh, R., Munshi, A., & Panda, S. K. (1992). Polymerase chain reaction. *The National medical journal of India*, 5(3), 115–119.
46. Rehman, M. U., Yang, H., Zhang, S., Huang, Y., Zhou, R., Gong, S., Feng, Q., Chen, S., Yang, J., Yang, Z., Abbas, M., Cui, M., Wang, M., Jia, R., Chen, S., Liu, M., Zhu, D., Zhao, X., Wu, Y., Yang, Q., ... Cheng, A. (2020). Emergence of *Escherichia coli* strains with multiple antibiotic resistances and shiga toxin-producing capability in humans and animals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 64(12), e02019. <https://doi.org/10.1128/AAC.02019-20>

- ia coli isolates producing NDM-1 carbapenemase from waterfowls in Hainan island, China. *Acta tropica*, 207, 105485. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105485>
47. Sisay, Mekonnen. (2015). A Review on Major Food Borne Bacterial Illnesses. *Journal of Tropical Diseases*. 03. 10.4172/2329-891X.1000176.
48. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0, 2022. <http://www.eucast.org>.
49. Vazeille, E., Chassaing, B., Buisson, A., Dubois, A., de Vallée, A., Billard, E., Neut, C., Bommelaer, G., Colombel, J. F., Barnich, N., Darfeuille-Michaud, A., & Bringer, M. A. (2016). GipA Factor Supports Colonization of Peyer's Patches by Crohn's Disease-associated Escherichia Coli. *Inflammatory bowel diseases*, 22(1), 68–81. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000609>
50. Vera-Leiva, A., Barría-Loaiza, C., Carrasco-Anabalón, S., Lima, C., Aguayo-Reyes, A., Domínguez, M., Bello-Toledo, H., & González-Rocha, G. (2017). KPC: Klebsiella pneumoniae carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias [KPC: Klebsiella pneumoniae carbapenemase, main carbapenemase in Enterobacteriaceae]. *Revista chilena de infectología : organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectología*, 34(5), 476–484. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182017000500476>
51. Vlisidou, I., Dziva, F., La Ragione, R. M., Best, A., Garmendia, J., Hawes, P., Monaghan, P., Cawthraw, S. A., Frankel, G., Woodward, M. J., & Stevens, M. P. (2006). Role of intimin-tir interactions and the tir-cytoskeleton coupling protein in the colonization of calves and lambs by Escherichia coli O157:H7. *Infection and immunity*, 74(1), 758–764. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.1.758-764.2006>
52. Watahiki, M., Isobe, J., Kimata, K., Shima, T., Kanatani, J., Shimizu, M., Nagata, A., Kawakami, K., Yamada, M., Izumiya, H., Iyoda, S., Morita-Ishihara, T., Mitobe, J., Terajima, J., Ohnishi, M., & Sata, T. (2014). Characterization of enterohemorrhagic Escherichia coli O111 and O157 strains isolated from outbreak patients in Japan. *Journal of clinical microbiology*, 52(8), 2757–2763. <https://doi.org/10.1128/JCM.00420-14>
53. Wellington, E. M., Boxall, A. B., Cross, P., Feil, E. J., Gaze, W. H., Hawkey, P. M., Johnson-Rollings, A. S., Jones, D. L., Lee, N. M., Otten, W., Thomas, C. M., & Williams, A. P. (2013). The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. *The Lancet. Infectious diseases*, 13(2), 155–165. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70317-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70317-1)
54. World Health Organization. 2014. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance 2014
55. Yang, S. C., Lin, C. H., Aljuffali, I. A., & Fang, J. Y. (2017). Current pathogenic Escherichia coli foodborne outbreak cases and therapy development. *Archives of microbiology*, 199(6), 811–825. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1393-y>
56. Zhang, J., Chen, L., Wang, J., Yassin, A. K., Butaye, P., Kelly, P., Gong, J., Guo, W., Li, J., Li, M., Yang, F., Feng, Z., Jiang, P., Song, C., Wang, Y., You, J., Yang, Y., Price, S., Qi, K., Kang, Y., ... Wang, C. (2018). Molecular detection of colistin resistance genes (mcr-1, mcr-2 and mcr-3) in nasal/oropharyngeal and anal/cloacal swabs from pigs and poultry. *Scientific reports*, 8(1), 3705. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22084-4>
57. Zhang, T., Lu, H., Wang, L., Yin, M., & Yang, L. (2018). Specific expression pattern of IMP metabolism related-genes in chicken muscle between cage and free range conditions. *PloS one*, 13(8), e0201736. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201736>