

DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA CULTIVO-INDEPENDIENTE
PARA EVALUAR LA PREVALENCIA Y DIVERSIDAD DE GENES DE
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN POBLACIONES BACTERIANAS
EN MUESTRAS CLÍNICAS Y AMBIENTALES TESIS

2024

Lic. Bioanálisis Clínico

Amanda de la Caridad Lahera Champagne



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA CULTIVO-INDEPENDIENTE PARA EVALUAR LA
PREVALENCIA Y DIVERSIDAD DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN
POBLACIONES BACTERIANAS EN MUESTRAS CLÍNICAS Y AMBIENTALES

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el
Grado de

Maestra en Química Clínica Diagnóstica

Presenta

Amanda de la Caridad Lahera Champagne

Dirigido por:

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales

Co-Director:

Dra. Mussaret Zaidi Jacobson

Querétaro, Qro. Noviembre 2024

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Química Clínica Diagnóstica

DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA CULTIVO-INDEPENDIENTE PARA EVALUAR
LA PREVALENCIA Y DIVERSIDAD DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS
EN POBLACIONES BACTERIANAS EN MUESTRAS CLÍNICAS Y AMBIENTALES

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Maestra en Química Clínica Diagnóstica

Presenta

Lic. Amanda de la Caridad Lahera Champagne

Dirigido por:

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales

Co-dirigido por:

Dra. Mussaret Zaidi Jacobson

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales

Presidente

Dra. Mussaret Zaidi Jacobson

Secretario

Dra. Karla Isabel Lira de León

Vocal

M. I. M. David Gustavo García Gutiérrez

Suplente

Mtra. Alma Delia Bertadillo Jilote

Suplente

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, a Dios por tener dentro de sus planes el que yo cumpliera este sueño. Agradecerme a mí por tener la valentía de perseguir lo que quería a pesar de que significara estar lejos de mi familia y de mi tierra.

Agradecer a la Universidad Autónoma de Querétaro por abrirme sus puertas. Al programa de Maestría en Química Clínica Diagnóstica por aceptarme.

A todos los docentes que aportaron su granito de arena para mi crecimiento personal y profesional a lo largo de estos 2 años, especialmente a mis sinodales, gracias por formar a la Amanda del presente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme una beca durante mi estancia en la realización de este proyecto de investigación.

A mi familia por siempre apoyarme y confiar en mí, en especial a mi mamá y mis hermanas, ustedes han sido mi mayor inspiración, gracias por darme el apoyo físico y emocional que me permitió mantenerme firme aun estando lejos de casa. Gracias mamá por ser la primera persona en este mundo en confiar en mí aún sin conocerme.

A mi familia de patria que han estado a mi lado desde el inicio, gracias por escuchar mis pesares y siempre acompañarme. A mis compañeros de laboratorio, por siempre brindarme la oportunidad de aprender y por todo el apoyo y compañía.

A mi asesor el Dr. Nava por abrirme las puertas del laboratorio, por todo lo que ha aportado en mi crecimiento profesional y personal, por todo el conocimiento nuevo, por brindarme la oportunidad de crecer profesionalmente bajo su asesoría.

También quiero agradecerle a la vida por darme la oportunidad, firmeza, entereza y las herramientas necesarias para cumplir esta meta.

Muchas gracias

ÍNDICE GENERAL

Apéndice	Contenido	Página
	Agradecimientos	iii
	Índice general	iv
	Índice de cuadros	viii
	Índice de figuras	x
	Abreviaturas	xi
	Resumen	xii
	Summary	xiii
	Declaración de responsabilidad de estudiante	xiv
I.	Introducción	1
I.1	Planteamiento	2
I.2	Justificación	2
II.	Antecedentes	3
II.1	Resistencia antibiótica desde el enfoque de Una Salud	3
II.2	Patógenos prioritarios resistentes a antibióticos	3
II.3	Mecanismo de resistencia bacteriana	5
II.3.1	Cambios mutacionales	5
II.3.2	Producción de enzimas para alteración e inactivación del antibiótico	6
II.3.3	Modificación del sitio de unión al antibiótico	6
II.3.4	Reducción de la acumulación intracelular de antibiótico	7
II.3.5	Formación de biopelículas	7
II.3.6	Transferencia horizontal de genes	8
II.4	Determinantes genéticas que confieren resistencia a antibióticos	8
II.5	Métodos de detección de BRA	10
II.5.1	Métodos cultivo-dependiente	10
II.5.2	Métodos cultivo-independiente	11
III.	Objetivos	14
III.1	Objetivos generales	14
III.2	Objetivos particulares	14

III.3	Objetivos profesionalizantes	14
IV.	Metodología	15
IV.1	Materiales	15
IV.1.1	Equipos	15
IV.1.2	Reactivos	15
IV.1.3	Enzimas comerciales para qPCR	15
IV.1.4	Suministros	15
IV.2	Métodos	16
IV.2.1	Selección de determinantes genéticas mediante análisis genómicos comparativos	16
IV.2.2	Análisis de alelos de DGRA	17
IV.2.3	Análisis de especificidad y cobertura de iniciadores de qPCR	17
IV.2.4	Diseño de iniciadores de qPCR	17
IV.2.5	Estandarización y validación de ensayos de qPCR para detección y cuantificación de DGRA	17
IV.2.5.1	Material biológico	17
IV.2.5.2	Extracción de ADN	19
IV.2.5.3	Selección de las temperaturas óptimas de alineación de los iniciadores de qPCR	19
IV.2.5.4	Sensibilidad, Eficiencia y Reproducibilidad	20
IV.2.5.5	Especificidad	20
IV.2.6	Implementación de ensayos de qPCR para detección y cuantificación de DGRA	21
IV.2.6.1	Material biológico	21
IV.2.6.2	Extracción de ADN	21
IV.2.6.3	Ensayos de qPCR para identificación y cuantificación de DGRA en muestras ambientales y clínicas	22
IV.3	Análisis estadístico	22
V	Resultados y discusión	23
V.1	Identificación de DGRA de importancia en sistemas de producción animal.	23
V.1.2	Evaluación de DGRA por criterios	24

V.1.2.1	Criterios 1 y 2	24
V.1.2.2	Criterio 3	29
V.1.2.3	Criterios 4 y 5	30
V.1.2.4	Criterios 6 y 7	31
V.1.2.5	Criterio 8	32
V.2	Diversidad de alelos por familia de DGRA	34
V.3	Análisis familia <i>aadA</i>	35
V.3.1	Identificación, análisis y diseño de iniciadores de PCR	35
V.4	Análisis familia <i>bla</i>	36
V.4.1	Identificación, análisis y diseño de iniciadores de PCR	37
V.5	Análisis familia <i>qnr</i>	43
V.5.1	Identificación, análisis y diseño de iniciadores de PCR	43
V.6	Análisis familia <i>tet</i>	44
V.6.1	Identificación, análisis y diseño de iniciadores de PCR	45
V.7	Análisis familia <i>erm</i>	47
V.7.1	Identificación, análisis y diseño de iniciadores de PCR	47
V.8	Análisis familia <i>sul</i>	48
V.8.1	Identificación, análisis y diseño de iniciadores de PCR	48
V.9	Estandarización de ensayos de qPCR para detección de DGRA	49
V.9.1	Estandarización de temperaturas de alineación de iniciadores de qPCR diseñados en el presente estudio empleando ADN de aislamientos	49
V.9.2	Estandarización de temperaturas de alineación de iniciadores de qPCR diseñados en el presente estudio empleando ADN ambiental.	51
V.9.3	Estandarización de temperaturas de alineación de iniciadores de qPCR reportados en la literatura.	52
V.9.4	Estandarización de iniciadores de qPCR para amplificación de gen <i>16SrRNA</i> .	55
V.10	Estandarización y validación de ensayos de qPCR para detección de DGRA	57
V.11	Detección de DGRA de importancia en salud pública y veterinaria en muestras clínicas y ambientales.	58

VI.	Limitantes del estudio	64
VII.	Conclusiones	65
VIII	Referencias	66
Anexo 1.	Iniciadores de PCR diseñados	77
Anexo 2.	Iniciadores para amplificación gen <i>16SrRNA</i> identificados en la literatura.	78
Anexo 3.	Iniciadores de PCR previamente validados y estandarizados en estudios anteriores empleados en el presente estudio.	79

ÍNDICE DE CUADROS

No. Cuadro	Contenido	Pág.
Cuadro 1.	Lista de patógenos prioritarios establecidos por la OMS (2021)	4
Cuadro 2.	Relación antibiótico / determinante genética encontrado en estudios de muestras clínicas	9
Cuadro 3.	Relación antibiótico / determinante genética encontrado en estudios de muestras ambientales	10
Cuadro 4.	Colección de DGRA en el cepario del Laboratorio de Microbiología Molecular	18
Cuadro 5.	Gradientes de temperaturas de alineación de iniciadores de PCR utilizados.	20
Cuadro 6.	Cantidades y volúmenes empleados para la extracción de ADN ambiental.	22
Cuadro 7.	DGRA identificadas de mayor importancia en sistemas de producción animal.	34
Cuadro 8.	Base de datos de DGRA y porcentaje de identidad entre familias de DGRA.	35
Cuadro 9.	Iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de la familia <i>aadA</i> .	36
Cuadro 10	Base de datos de DGRA y porcentaje de identidad de subfamilias <i>bla</i> .	37
Cuadro 11.	Iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de la subfamilia <i>blaTEM</i> .	38
Cuadro 12.	Iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de la subfamilia <i>blaSHV</i> .	38
Cuadro 13.	Iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de la subfamilia <i>blaCMY</i> .	39
Cuadro 14.	Iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de la subfamilia <i>blaCTX-M</i> .	39
Cuadro 15.	Iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de la subfamilia <i>blaOXA</i> .	41
Cuadro 16.	Base de datos de DGRA y porcentaje de identidad por subfamilias <i>qnr</i> .	43
Cuadro 17.	Iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de las subfamilias <i>qnrS</i> y <i>qnrB</i> .	44

Cuadro 18.	Porcentaje de identidad de genes que confieren resistencia a tetraciclinas por mecanismo de acción.	45
Cuadro 19.	Iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de alelos <i>tetA</i> , <i>tetO</i> , <i>tetM</i> , <i>tetW</i> y <i>tetQ</i>	46
Cuadro 20.	Iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de alelos <i>ermC</i> y <i>ermB</i> .	47
Cuadro 21.	Iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de alelos de la familia <i>sul</i> .	48
Cuadro 22.	Temperaturas de alineación seleccionadas los iniciadores de qPCR <i>qnr</i> , <i>blaTEM</i> , <i>blaCTX-M</i> y <i>blaCMY</i> .	49
Cuadro 23.	Temperaturas de alineación seleccionadas para los iniciadores de qPCR <i>tetPR</i> y <i>erm</i> .	52
Cuadro 24.	Temperaturas de alineación seleccionadas para los iniciadores de qPCR <i>aadA-L</i> , <i>blaSHV-L</i> , <i>sul1</i> y <i>sul2</i> .	53
Cuadro 25.	Parámetros obtenidos en las curvas de iniciadores de qPCR.	58

ÍNDICE DE FIGURAS

No. Figura	Contenido	Pág.
Figura 1.	Mecanismos de resistencia bacteriana	5
Figura 2.	Alteraciones de porinas	7
Figura 3.	Principales familias de antibióticos analizadas a través de DGRA y descritas en artículos científicos indexados (periodo: 2017 - 2023).	23
Figura 4.	Distribución de las DGRA que confieren resistencia a antibióticos de importancia crítica, importancia elevada e importantes para humanos y animales.	24
Figura 5.	DGRA identificadas en estudios ambientales y de producción animal.	26
Figura 6.	Número de reportes de las diferentes DGRA identificadas. A) estudios ambientales. B) entornos de producción animal.	28
Figura 7.	DGRA más comunes en entorno ambiental, sistemas de producción animal y ambos.	29
Figura 8.	DGRA relacionadas con patógenos multirresistentes de importancia.	30
Figura 9.	Clasificación de antibióticos a los cuales las DGRA identificadas confieren resistencia.	31
Figura 10.	Presencia de DGRA en sistemas y bases de datos de monitoreo de resistencia.	32
Figura 11.	Análisis de cocurrencia de las DGRA seleccionadas.	33
Figura 12.	Gradientes de temperatura para estandarización de iniciadores de qPCR diseñados en el presente estudio con ADN de aislamientos	50
Figura 13.	Gradientes de temperatura para estandarización de iniciadores de qPCR diseñados en el presente estudio con ADN ambiental.	52
Figura 14.	Gradientes de temperatura para estandarización de iniciadores de qPCR reportados en la literatura.	54
Figura 15.	Gradientes de temperatura para estandarización de iniciadores de qPCR para amplificación de gen int1	55
Figura 16.	Cobertura iniciadores de qPCR dirigidos a la amplificación del gen 16SrRNA reportados en la literatura.	56
Figura 17	Gradientes de temperatura de alineación de iniciadores de qPCR dirigidos a la amplificación del gen 16SrRNA reportados en la literatura	57
Figura 18.	Abundancia relativa de DGRA de interés por tipo de muestra en número de copias expresados en log ₁₀ .	61
Figura 19	Abundancia relativa de DGRA de interés en número de copias expresados en log ₁₀ .	62

ABREVIATURAS

<i>BRA</i>	Bacterias resistentes a antibióticos
<i>OMS</i>	Organización Mundial de la Salud
<i>qPCR</i>	PCR en tiempo real
<i>EE.UU.</i>	Estados Unidos
<i>ADN</i>	Ácido desoxirribonucleico
<i>EGM</i>	Elementos genéticos móviles
<i>THG</i>	Transferencia horizontal de genes
<i>SI</i>	Secuencias de inserción
<i>Tn</i>	Transposones
<i>tnp</i>	Transposasas
<i>EMA</i>	Enzimas modificadoras de aminoglucósidos
<i>CAT</i>	Cloranfenicol acetiltransferasas
<i>DGRA</i>	Determinantes genéticas que confieren resistencia a antibióticos
<i>PCR</i>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<i>NARMS</i>	Sistema Nacional de Monitoreo de Resistencia Antimicrobiana
<i>CARD</i>	Base de datos integral de resistencia a los antibióticos
<i>IUPAC</i>	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
<i>LoD</i>	Límite de detección
<i>LoQ</i>	Límite de cuantificación
<i>BLEEs</i>	β -lactamasas de espectro extendido

RESUMEN

El aumento de bacterias resistentes a los antibióticos (BRA) es un problema prioritario reconocido por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Desde el contexto de Una Salud representa una de las principales amenazas para la salud humana, animal y ambiental. Desde hace más de 5 años se ha señalado que las BRA podrían ser las causantes de la siguiente gran pandemia. Hasta la actualidad solo ~ 1% de las bacterias han podido ser cultivadas usando métodos cultivo-dependiente. Esta desventaja dificulta considerablemente la detección y cuantificación de BRA prevalente en muestras clínicas y ambientales; principalmente en estudios enfocados a la reducción de BRA. Apoyado en esta premisa, el presente trabajo tiene como objetivo desarrollar una herramienta molecular cultivo-independiente basada en la PCR cuantitativa (qPCR) para determinar la prevalencia y diversidad de genes de resistencia a antibióticos en poblaciones bacterianas en muestras clínicas (excretas) y ambientales (suelo) asociadas a producción animal. Para este fin se identificaron las determinantes genéticas de resistencia a antibióticos (DGRA) de mayor importancia en salud pública y veterinaria (*tetM*, *tetO*, *tet(W)*, *tetA*, *tet(Q)*, *blaCTX-M*, *blaCTX-M15*, *blaCMY-2*, *blaTEM*, *blaSHV*, *ermB*, *ermC*, *sul1*, *sul2*, *qnrB*, *qnrS*, *aadA*), se analizaron 1953 alelos con el objetivo de conocer la variabilidad genética de cada familia identificada y se evaluaron en cuanto a cobertura y especificidad 95 iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de estas DGRA. Se estandarizaron los iniciadores de qPCR previamente evaluados, permitiendo la utilización de esta metodología para el análisis de prevalencia, distribución y abundancia de las DGRA identificadas en este estudio en un total de 80 muestras provenientes de sistemas de producción animal. Se observó una elevada prevalencia de elementos genéticos móviles (*intl1*) asociados a resistencia a antibióticos (RAM) y genes que confieren resistencia a quinolonas (*qnrB*: 100%), sulfamida (*sul1* y *sul2*: 99%) y betalactámicos (*blaTEM*, *blaSHV* y *blaCMY*: 92%). El gen *intl1* tuvo la mayor abundancia relativa, seguido de *sul1*, *qnrB*, *sul2*, *blaSHV*, *blaCMY* y *blaTEM*. En general en las muestras de suelo se observó una mayor abundancia de genes de resistencia a antibióticos (DGRA) comparado con excretas de sistemas de producción bovino, porcino. En conjunto estos resultados sugieren que las BRA son altamente prevalentes y abundantes en sistemas de producción animal intensiva. Finalmente, el desarrollo e implementación de esta metodología será fundamental para cuantificar, de manera objetiva y precisa DGRA presentes en entornos de producción animal, permitiendo evaluar y comparar prevalencia y diversidad de genes de resistencia a antibióticos de importancia clínica y veterinaria.

Palabras claves: Bacterias resistentes a antibióticos (BRA), PCR cuantitativa (qPCR), Determinantes genéticas de resistencia a antibióticos (DGRA)

SUMMARY

The increase in antibiotic-resistant bacteria (ARB) is a priority problem recognized by the World Health Organization (WHO). From the context of One Health, it represents one of the main threats to human, animal and environmental health. For more than 5 years, it has been pointed out that ARBs could be the cause of the next major pandemic. To date, only ~ 1% of bacteria have been cultivated using culture-dependent methods. This disadvantage considerably hinders the detection and quantification of prevalent ARB in clinical and environmental samples; mainly in studies focused on ARB reduction. Based on this premise, the present work aims to develop a culture-independent molecular tool based on quantitative PCR (qPCR) to determine the prevalence and diversity of antibiotic resistance genes in bacterial populations in clinical samples (excreta) and environmental (soil) associated with animal production. For this purpose, the genetic determinants of antibiotic resistance (DGRA) of greatest importance in public and veterinary health were identified (*tetM*, *tetO*, *tet(W)*, *tetA*, *tet(Q)*, *blaCTX-M*, *blaCTX-M15*, *blaCMY-2*, *blaTEM*, *blaSHV*, *ermB*, *ermC*, *sul1*, *sul2*, *qnrB*, *qnrS*, *aadA*), 1953 alleles were analyzed with the aim of knowing the genetic variability of each identified family and 95 PCR primers aimed at the amplification of these were evaluated for coverage and specificity DGRA. The previously evaluated qPCR primers were standardized, allowing the use of this methodology for the analysis of prevalence, distribution and abundance of the DGRAs identified in this study in a total of 80 samples from animal production systems. A high prevalence of mobile genetic elements (*intl1*) associated with antibiotic resistance (RAM) and genes that confer resistance to quinolones (*qnrB*: 100%), sulfonamide (*sul1* and *sul2*: 99%) and beta-lactams (*blaTEM*, *blaSHV* and *blaCMY*: 92%). The *intl1* gene had the highest relative abundance, followed by *sul1*, *qnrB*, *sul2*, *blaSHV*, *blaCMY*, and *blaTEM*. In general, a greater abundance of antibiotic resistance genes (DGRA) was observed in soil samples compared to excreta from bovine and pig production systems. Together these results suggest that ARB are highly prevalent and abundant in intensive animal production systems. Finally, the development and implementation of this methodology will be essential to objectively and accurately quantify DGRAs present in animal production environments, allowing the evaluation and comparison of prevalence and diversity of antibiotic resistance genes of clinical and veterinary importance.

Keywords: Antibiotic resistant bacteria (ARB), quantitative PCR (qPCR), Genetic determinants of antibiotic resistance (GDAR)

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and a final downward stroke.

I. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reconocido el aumento de bacterias resistentes a los antibióticos (BRA) como una de las principales diez amenazas a la salud en la actualidad, convirtiéndose este fenómeno en un problema global que afecta a seres humanos, animales y ambiente (Boin et al., 2021). Las infecciones por BRA aumentan la morbilidad y mortalidad de humanos y animales (Sharif et al., 2023), se prevé que para 2050 las muertes causadas por BRA superen el número de muertes causado por cáncer, alcanzando cifras de ~ 10 millones de defunciones anuales (Samreen et al., 2021). La principal causa de aumento de BRA es el uso inadecuado de antibióticos tanto en seres humanos, animales y plantas (Liang et al., 2021; Schar et al., 2020); tal como los sectores de producción animal, donde se utiliza más de la mitad de los antibióticos producidos a nivel mundial (Mulchandani et al., 2023). Teniendo en cuenta el aumento de la población mundial y por consiguiente la demanda de proteína animal hasta ~ 70% para 2050, se estima que la producción animal a nivel mundial utilizará más de 200 mil toneladas de antibióticos al año (He et al., 2020).

La economía de los países también se ve afecta por las infecciones por BRA, por ejemplo, solamente en EE.UU. se invierten ~ 3 billones de dólares al año en tratamientos clínicos y hospitalarios para combatir infecciones por BRA (Samreen et al., 2021). A nivel mundial, se estima que este problema causará una disminución del producto interno bruto (PIB) entre el 2 % - 3.5 %, lo que causaría pérdidas de ~ 100 billones de dólares a nivel mundial (Ruckert et al., 2024).

En los últimos años ha aumentado la incidencia de BRA en la producción animal debido al uso intensivo de antibióticos en los sistemas de producción de carne, huevo y leche (Mulchandani et al., 2023). Por ejemplo, estudios en unidades de producción animal han revelado una alta prevalencia de *E. coli* (~ 90 %), *Salmonella spp.* (~ 85 %), *Shigella* (~ 65 %), *Campylobacter spp.* (~ 50 %) resistentes a antibióticos (Mak et al., 2022; C. Xu et al., 2022). Una gran proporción de las bacterias recuperadas en las unidades de producción son resistentes a más de una familia de antibióticos, lo que aumenta el riesgo para la salud humana y animal, además de reducir las

alternativas de tratamientos para el control de infecciones bacterianas (Gebeyehu, 2021).

I.1 Planteamiento del problema

El análisis de la prevalencia, distribución y abundancia de BRA en diferentes entornos es fundamental para mantener la salud pública; sin embargo, estos estudios no se pueden realizar mediante métodos cultivo-dependientes (convencionales), ya que ~ 1 % de las bacterias se han logrado cultivar (Brinkac et al., 2017); por lo tanto, la prevalencia de BRA en muestras clínicas o ambientales continúa siendo desconocida hasta la fecha. Para realizar un estudio epidemiológico de BRA es necesario implementar métodos cultivo-independiente lo que permitiría estimar mediante datos más confiables prevalencia, distribución y abundancia de BRA mediante la detección de determinantes genéticas que confieren resistencia a antibióticos (DGRA).

I.2 Justificación

El aumento de BRA y su propagación en diferentes entornos constituye un problema prioritario de salud pública que involucra humanos, animales y ambiente. En la actualidad la alta prevalencia de BRA está provocando la escasez de efectivos tratamientos para el control de infecciones bacterianas (Kim & Cha, 2021).

El desarrollo e implementación de una herramienta epidemiológica que facilite la detección de BRA, en diferentes tipos de muestras basado en una técnica cultivo-independiente como sería la PCR cuantitativa (qPCR), permitirá la estimación de prevalencia y abundancia de BRA, disminuyendo las limitaciones que presentan los métodos cultivo-dependiente (Karkman et al., 2018). El método molecular propuesto podría utilizarse para identificar los ambientes con mayor prevalencia y diversidad de BRA mediante la detección de DGRA, lo que permitirá contar con un marco de referencia para elaborar estrategias que disminuyan la presencia y distribución de estas bacterias en los entornos analizados.

II. ANTECEDENTES

II.1 Resistencia a antibióticos desde el enfoque de una salud.

Una Salud es un enfoque unificado e integrado diseñado para equilibrar y mejorar la salud de seres humanos, animales y ecosistemas (Sinclair, 2019), teniendo como principal objetivo reducir la transmisión de enfermedades zoonóticas y antropogénicas que pongan en peligro la salud de humanos y animales (McEwen & Collignon, 2018). Uno de los temas de enfoque de Una Salud es la propagación de BRA entre humanos-animales-ambiente (Barton Behravesh, 2019), puesto que alrededor del 60% de los patógenos que causan enfermedades humanas son de origen animal (Allel et al., 2023). Las BRA y determinantes genéticas que confieren resistencia a antibióticos (DGRA) se transfieren con relativa facilidad entre humanos, animales y ambiente (Laiglesia et al., 2022).

II.2 Patógenos prioritarios resistentes a antibióticos.

En la actualidad, se ha evidenciado un aumento de enfermedades infecciosas por causas de BRA a nivel mundial, siendo en muchos casos estas bacterias resistentes a más de una familia de antibióticos. Debido a esto, en el 2021, la OMS publicó una lista de patógenos prioritarios multirresistentes que servirá de base para estudios epidemiológicos y el desarrollo de nuevos tratamientos efectivos contra infecciones bacterianas (Cuadro 1) (OMS, 2021). Los criterios para la inclusión de patógenos en la lista utilizados por la OMS fueron los siguientes: i) la tasa de mortalidad de las infecciones que causan; ii) si el tratamiento requiere o no de un largo periodo de hospitalización; iii) con qué frecuencia muestran resistencia a los antibióticos existentes; iv) la facilidad con la que se transmiten entre animales, de animales a humanos y entre humanos; (v) si las infecciones que causan se pueden prevenir o no, (por ejemplo con una mejor higiene o un periodo de vacunación); vi) y si se han investigado y desarrollado nuevos antibióticos para tratar las infecciones que causan. Es importante resaltar que varios microorganismos citados en esta lista son prevalentes en las unidades de producción animal y todos ellos son patógenos con potencial zoonótico.

Cuadro 1. Lista de patógenos prioritarios establecidos por la OMS (OMS, 2021).

Clasificación	Patógeno	Resistencia
Prioridad crítica	- <i>Acinetobacter baumannii</i> - <i>Pseudomona aeruginosa</i> - <i>Familia Enterobacteriaceae</i>	-Carbapenémicos -Productores de β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs)
Prioridad elevada	- <i>Enterococcus faecium</i> - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Helicobacter pylori</i> - <i>Campylobacter spp</i> - <i>Salmonella spp.</i> - <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-Vancomicina -Meticilina -Claritromicina -Fluoroquinolonas -Cefalosporinas
Prioridad media	- <i>Streptococcus pneumoniae</i> - <i>Haemophilus influenzae</i> - <i>Shigella spp.</i>	-Penicilina -Fluoroquinolonas

Por décadas, la producción masiva de alimentos, incluyendo carne, huevo, leche y pescado ha dependido del uso de antibióticos como promotores del crecimiento. Esta práctica ha logrado mantener la seguridad alimentaria en la mayoría de los países del mundo. Sin embargo, un efecto colateral de esta estrategia es el surgimiento y dispersión de BRA (Rahman et al., 2022). En los últimos años se ha reportado una elevada prevalencia de miembros de la familia *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémicos, fluoroquinolonas y β -lactámicos (Huber et al., 2021; Jibril et al., 2021; Pornsukarom et al., 2018; Teng et al., 2022). Por lo tanto, es fundamental establecer estrategias de vigilancia epidemiológica para identificar y cuantificar la colonización y dispersión de BRA en muestras clínicas y ambientales. Para lograr este fin se debe identificar y cuantificar la abundancia relativa y diversidad de los genes que codifican para los diferentes mecanismos de resistencia a antibióticos (Cacace et al., 2019).

II.3 Mecanismos de resistencia bacteriana.

II.3.1 Cambios mutacionales.

Las bacterias pueden sufrir cambios en su secuencia genética (mutaciones puntuales cromosómicas) que pueden conferirles la capacidad de evadir los efectos de los antibióticos; si estas mutaciones tienen éxito, estos alelos pueden transmitirse a nuevas generaciones (Hernández-Mendoza et al., 2022). Nuevas variantes del gen pueden alterar el transporte y metabolismo de xenobióticos o alterar la estructura de la pared celular (Adi Wicaksono et al., 2022). La aparición de nuevos alelos también puede reducir los mecanismos activos de absorción de antibióticos, alterar sus objetivos moleculares y activar los mecanismos de excreción de moléculas antimicrobianas (**Figura 1**) (Gracia, 2021). Un ejemplo clásico de la importancia de estos alelos es la topoisomerasa II bacteriana, la ADN girasa o la ADN topoisomerasa IV, donde los cambios en un solo aminoácido, tirosina, en el sitio activo de la proteína confieren resistencia a las quinolonas (Zahari et al., 2023).

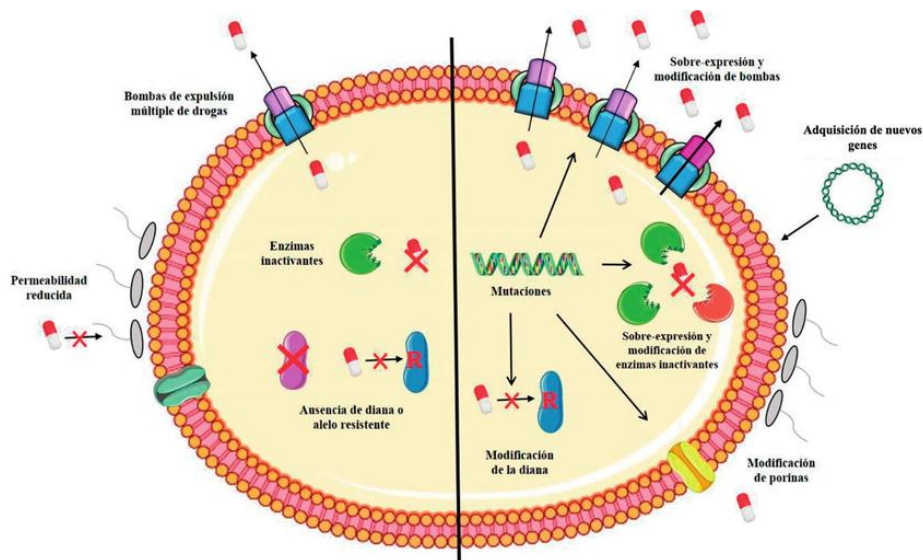


Figura 1. Mecanismos de resistencia bacteriana. Tomado de Gracia, 2021.

II.3.2 Producción de enzimas para alteración e inactivación del antibiótico.

Mediante reacciones bioquímicas como la acetilación y la fosforilación de antibióticos aminoglucósidos y anfenicoles (cloranfenicol) y la adenilación en lincosamidas, las bacterias pueden provocar la destrucción o neutralización irreversible del fármaco; este proceso es resultado de producción de enzimas bacterianas que generan cambios químicos en el antibiótico (Atassi et al., 2023).

Un ejemplo de proteínas que alteran o inactivan antibióticos son las enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMA), que modifican de forma covalente los grupos hidroxilo o amino de la molécula (Lund et al., 2023); estas enzimas son codificadas en su mayoría por los genes *aadA*, *aac(3)-IIa*, *aadB*, *aac(6`)-Ib* y *aph(3`)-Ia* (Atassi et al., 2023). Otro ejemplo son las β -lactamasas, que confieren resistencia a los antibióticos β -lactámicos mediante la destrucción del enlace amida del anillo β -lactámico; ejemplo de estas enzimas son TEM, SHV y CTX-M (Zahari et al., 2023). De manera similar, el cloranfenicol es modificado mediante la acetilación dependiente de acetil-CoA de su grupo 3-hidroxilo por las enzimas cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) (Lund et al., 2023).

II.3.3 Modificación del sitio de unión al antibiótico.

La resistencia a tetraciclinas y quinolonas son dos ejemplos característicos de este mecanismo de resistencia. En el caso de las tetraciclinas la resistencia es conferida por los genes *tetM* y *tetO*, que codifican para las proteínas de protección ribosomal (RPP). Estas proteínas actúan como homólogos de los factores de elongación que se utilizan en la síntesis de proteínas, interactuando con el ribosoma y desalojando al antibiótico de su sitio de unión de manera dependiente de GTP (Zahari et al., 2023). En el caso de la resistencia a quinolonas, la proteína QNR actúa como un homólogo de ADN y compite por el sitio de unión de la ADN girasa y la topoisomerasa IV, disminuyendo las oportunidades de la molécula antibiótica para estabilizar y formar el complejo ADN-quinolona (Zahari et al., 2023).

II.3.4 Reducción de la acumulación intracelular del antibiótico.

La alteración de canales proteicos en la membrana externa bacteriana para disminuir la entrada de antibiótico mediante alteraciones de porinas se evidencia por 3 mecanismos: i) cambio en el tipo de porinas expresadas en la superficie de la pared celular, ii) cambios en los niveles de expresión de las porinas y iii) deterioro de la función de la porina (Figura 2). Todos estos mecanismos disminuyen las concentraciones de antibióticos que ingresan en las células bacterianas (Zhou et al., 2023). Por otra parte, la presencia de bombas de eflujo tanto específicos de sustrato o con un amplio espectro, también contribuyen a la disminución de la cantidad de antibiótico acumulada en el interior de la célula bacteriana; este mecanismo afecta principalmente a las fluoroquinolonas, betalactámicos, carbapenémicos y polimixinas (Zahari et al., 2023).

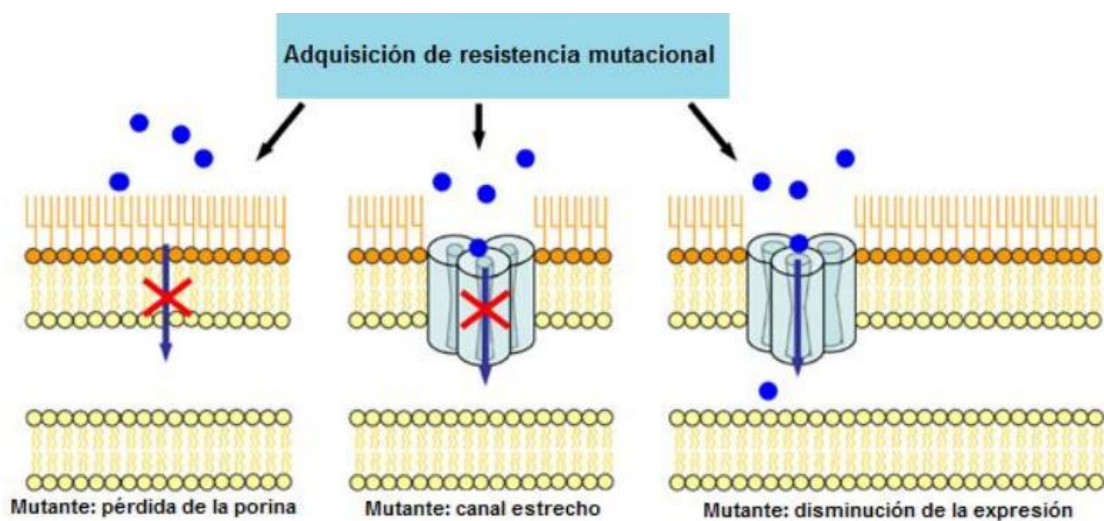


Figura 2. Alteraciones de porinas. Tomado de Fernández, 2012.

II.3.5 Formación de biopelículas

Las biopelículas son estructuras microbianas protegidas, rodeadas de una matriz extracelular autosecretada. Son constituidas por sustancias poliméricas extracelulares (SPE) que proporciona protección mecánica dificultando el acceso del antibiótico a las células y a la vez modifica las condiciones bioquímicas, necesarias para atenuar la actividad de los antibióticos (Mishra et al., 2024). El SPE se compone

principalmente de polisacáridos, proteínas, lípidos y ADN extracelular (Li et al., 2023), brinda protección a las células bacterianas de las agresiones ambientales, principalmente físicas y químicas (Maillard & Centeleghe, 2023).

II.3.6 Transferencia horizontal de genes.

La transferencia horizontal de genes (THG) permite la diversificación de los genomas y genera un potencial para aumentar el repertorio de mecanismos que confieren resistencia a los antibióticos (Pilla et al., 2017). La THG puede ocurrir por 3 mecanismos: i) a través de la conjugación de plásmidos entre bacterias resistentes y susceptibles; ii) la transformación, lo cual sería el resultado de la adquisición y expresión del ADN exógeno; y iii) la transducción donde se involucran bacteriófagos que transfieren ADN de una bacteria resistente a una sensible (Munita y Arias, 2016; Rodrigues et al., 2018).

En la THG es necesaria la presencia de elementos genéticos móviles (EGM) como: i) plásmidos conjugativos, conocidos como estructuras extracromosómicas de replicación independiente, que pueden insertarse en las bacterias conteniendo genes de resistencia (Partridge et al., 2018); ii) integrones portadores de casetes de genes de resistencia (en muchos casos más de un casete) (Gillings, 2014; Gillings et al., 2015) y iii) transposones (Tn) quienes llevan información genética para poder moverse dentro del genoma y están asociados con secuencias de inserción (SI) que realizan dicha transferencia genética mediante mecanismos replicativos, donde el transposón mediante la combinación de replicación y recombinación se incorpora en la célula aceptora (Chandler et al., 2015; Roberts et al., 2008).

II.4 Determinantes genéticas que confieren resistencia a antibióticos.

Las determinantes genéticas que codifican para resistencia a antibióticos son validadas mediante pruebas fenotípicas que confirman su capacidad de conferir resistencia bacteriana. Estudios recientes han evidenciado la presencia de determinantes genéticos de resistencia a antibióticos (DGRA) en muestras clínicas de animales en producción (Cuadro 2). Las exposiciones a macrólidos, lincomicina y tetraciclina se correlacionan positivamente con un aumento en la prevalencia de

bacterias que poseen los genes *ermB*, *ermF* y *tet(W)*; respectivamente (Birkegård et al., 2017).

Cuadro 2. Relación antibiótico/determinante genética (DGRA) encontrada en estudios de muestras clínicas de animales de producción.

Antibiótico	Determinante genética	Referencia
Tetraciclinas	<i>tetO</i> , <i>tetQ</i> , <i>tetW</i> , <i>tetL</i> , <i>tetX</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>tetM</i>	(Birkegård et al., 2017; Gu et al., 2020; He et al., 2020; Horie et al., 2021; Petrin et al., 2019; Turcotte et al., 2020)
Sulfamidas	<i>sul1</i> , <i>sul2</i>	(Gu et al., 2020, Horie et al., 2021)
Macrólidos	<i>armB</i> , <i>ermC</i> , <i>ermB</i> , <i>ermF</i>	(Gu et al., 2020,; Horie et al., 2021; Petrin et al., 2019; Turcotte et al., 2020)
Quinolonas	<i>qnrS</i> , <i>qnrB</i>	(Petrin et al., 2019)
β-lactámicos	<i>blaOXA-1</i> , <i>blaTEM-1</i> , <i>blaampC</i>	(Gu et al., 2020)

Por otra parte, estudios con muestras ambientales demostraron que las bacterias recuperadas poseen resistencia a antibióticos de importancia crítica en humanos y animales (Cuadro 3). Estos estudios revelan correlaciones positivas entre los genes *ermB* y *tetM*, sugiriendo la coexistencia de estos genes en uno o varios microorganismos (Zhu et al., 2021) (Shen et al., 2008). También se ha demostrado correlación positiva entre los genes *tetA*, *tetQ*, *tetM*, *ermB*, *oqxB* y el *int1* (Qian et al., 2018).

Cuadro 3. Relación antibiótico/determinante genética (DGRA) encontrada en estudios de muestras ambientales en entornos de producción animal.

Antibiótico	Determinante genética	Referencia
Tetraciclinas	<i>tetW, tetM, tetL, tetM, tetX, tetA, tetQ, tetO</i>	(Böckelmann et al., 2009; Cauwerts et al., 2007; Chen et al., 2007; Laconi et al., 2021; Liu et al., 2020; Macedo et al., 2020, 2021; Mazhar et al., 2021; Qian et al., 2018; Zhu et al., 2021)
Sulfamidas	<i>sul1, sul2</i>	(Liu et al., 2020; Macedo et al., 2020; Zhu et al., 2021)
Marcadores de integrón de clase 1	<i>intl1</i>	(Liu et al., 2020)
β -lactámicos	<i>blaTEM</i>	(Laconi et al., 2021; Mazhar et al., 2021; Zhu et al., 2021)
Macrólidos	<i>ermB</i>	(Cauwerts et al., 2007; Chen et al., 2007; Macedo et al., 2021; Zhu et al., 2021)

Actualmente, se ha propuesto la detección de DGRA como un indicador de la prevalencia y abundancia de BRA; sin embargo, estos estudios se ven afectados por las limitantes de los métodos cultivo-dependientes. Contar con una herramienta molecular para la detección y cuantificación de DGRA facilitaría los estudios epidemiológicos de BRA en muestras ambientales y clínicas.

II.5 Técnicas para detección de BRA.

II.5.1 Técnicas cultivo-dependiente.

Las técnicas convencionales para diagnóstico microbiológico se basan en el aislamiento, purificación y análisis de cultivos bacterianos utilizando medios bacteriológicos de pre-enriquecimiento, enriquecimiento, selectivos y propagación (Rohde et al., 2017). La selección de bacterias para estudios de resistencia a antibióticos se basa en análisis fenotípicos, morfológicos y pruebas bioquímicas (Lee et al., 2017). Una vez seleccionados los aislamientos se realizan las pruebas de sensibilidad al antibiótico, ya sea mediante el uso de la técnica de difusión en agar o con el método de microdilución (en caldo o agar) (Tang et al., 2017). Estos métodos cultivo-dependiente poseen varias desventajas entre las que destacan: i) el tiempo requerido para el aislamiento y cultivo, el cual varía entre los diferentes géneros bacterianos dependiendo de los requerimientos nutricionales y las estrategias de aislamiento (ej. la detección de perfiles de resistencia de bacterias de género *Salmonella spp.* tarda entre 48h y 5 días) (Gheyas y Burt, 2013); ii) la existencia de microorganismos que adquieren la propiedad fisiológica de viables no cultivables (Braga et al., 2013; Chahorm y Prakitchaiwattana, 2018; Lee et al., 2017) de los cuales se pudiera citar *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter y spp.*, *Escherichia coli* (Pokhrel et al., 2022; Z. Xu et al., 2021); iii) la dificultad de aislar patógenos intracelulares que requieren medios de cultivos especiales y medios de incubación prolongados (Böckelmann et al., 2009) como es el caso de *Legionella pneumophila*, *Coxiella burnetii*, *Listeria monocytogenes* y *Chlamydia trachomatis* (Best & Abu Kwaik, 2019) y iv) falta de información de los requerimientos nutricionales de diferentes grupos bacterianos, que solo se han identificado a través de métodos moleculares (bacterias del género *Chordicoccus* recientemente descubiertas)(Gutiérrez, 2011).

Basado en lo anterior, los métodos cultivo-dependiente no son idóneos para estudios epidemiológicos de prevalencia y diversidad de BRA en muestras clínicas y ambientales.

II.5.2 Técnicas cultivo-independiente.

Las técnicas cultivo-independiente se basan en la amplificación y caracterización del material genético de los microorganismos, estas técnicas son más sensibles, específicas y rápidas para la detección y cuantificación de microorganismos a partir de muestras clínicas y ambientales (Frasao et al., 2017; Nakajima et al., 2009; Rodrigues et al., 2020). Además, a diferencia de las técnicas cultivo-dependiente, las técnicas cultivo-independiente nos permiten identificar una gran variedad de genes de resistencia provenientes no solo de un microorganismo, sino del microbioma completo del ecosistema que se analizó. Para la detección de BRA se emplean técnicas moleculares basada en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La PCR es un método *in vitro* que permite la amplificación de forma exponencial de secuencias específicas de ADN con una alta especificidad (Rohde et al., 2017); permitiendo la detección de microorganismos sin la necesidad de cultivarlos (Adzitey et al., 2013). Esta técnica molecular cuenta con tres pasos fundamentales para su realización i) extracción del ADN; ii) amplificación *in vitro* por PCR y iii) análisis de los productos amplificados. Para cuantificar la cantidad de material genético presente en una muestra se desarrolló PCR en tiempo real (qPCR), la cual se basa en el principio de la PCR convencional y la cuantificación en tiempo real del material amplificado (Bell et al., 2015). La qPCR al igual que la PCR punto final, se realiza en un termociclador capaz de cambiar rápidamente la temperatura de la muestra para explotar las propiedades fisicoquímicas de los ácidos nucleicos y las propiedades enzimáticas de la ADN polimerasa. Sin embargo, la qPCR utiliza tintes intercalantes como SYBR Green o sondas fluorescentes en la mezcla; la capacidad del termociclador de proyectar un haz de luz de una longitud de onda específica sobre cada muestra permite detectar en cada ciclo la fluorescencia emitida por el fluorocromo excitado (Bell et al., 2015).

La qPCR posee innumerables ventajas como: i) la capacidad de monitorear el progreso de las reacciones en tiempo real; ii) permite una cuantificación muy precisa de la cantidad de material genético de partida en las muestras, midiendo con precisión la cantidad de amplicón en cada ciclo; iii) posee mayor rango dinámico de detección; y iv) elimina los riesgos de contaminación por manipulación ya que la

amplificación y cuantificación ocurren en un solo tubo, aunque al ser tan sensible hay riesgos de contaminación con otros ADN bacterianos (Bell et al., 2015; Chen et al., 2007). Dentro de las aplicaciones de la qPCR se encuentra el diagnóstico de enfermedades infecciosas mediante la detección y cuantificación de DGRA en muestras clínicas y ambientales (Birkegård et al., 2017; Petrin et al., 2019; Qian et al., 2018; Shen et al., 2008); además, en la industria se utiliza principalmente para la cuantificación de microbios en alimentos o en material vegetal (Frasao et al., 2017). Debido a las ventajas y utilidades que posee la qPCR sería una herramienta ideal para la realización de estudios epidemiológicos de detección de prevalencia y diversidad de BRA en muestras clínicas y ambientales obtenidas de entornos de producción animal.

III. OBJETIVOS

III.1 General

Desarrollar una herramienta molecular cultivo-independiente, para determinar prevalencia y diversidad de genes de resistencia a antibióticos en poblaciones bacterianas en muestras clínicas y ambientales.

III.2 Particulares

1. Realizar análisis genómicos comparativos para identificar las determinantes genéticas que confieren resistencia a antibióticos (DGRA) más prevalentes en poblaciones bacterianas.
2. Identificar la diversidad de alelos de las DGRA y establecer una estrategia molecular para su efectiva detección a través de ensayos basados en la PCR.
3. Diseñar, validar e implementar un ensayo de qPCR para cuantificar de manera efectiva y reproducible, la diversidad y abundancia relativa de DGRA en muestras clínicas y ambientales.

III.3 Profesionalizantes

1. Lograr la especialización en el empleo de herramientas bioinformáticas para el análisis de iniciadores de PCR, diseño y validación de protocolos de qPCR.
2. Alcanzar la especialización en la identificación, detección, cuantificación y análisis de genes de resistencia a antibióticos.
3. Adquirir el conocimiento óptimo en el tema de resistencia antimicrobiana desde la perspectiva Una Salud con énfasis en el desarrollo e implementación de técnicas moleculares para estudios epidemiológicos.

IV. METODOLOGÍA

IV.1 Materiales

IV.1.1 Equipo

- Fotodocumentador (MiniBis Pro)
- Mini-sistema de electroforesis horizontal (Bio-rad)
- Espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific)
- PowerLyzer® 24 Bench Top Bead-Based Homogenizer (MoBio)
- Termociclador tiempo real, modelo CFX96 Touch™ (Bio-rad)
- Termociclador, modelo c1000 de 96 pozos (Bio-rad)
- Centrífuga Velocity 14 (Dynamica)

IV.1.2 Reactivos

- Caldo LB (Lysogeny Broth)
- Kit de Extracción de ADN: Quick-DNA™ Miniprep Zymo Research (Catálogo 3024)
- Kit de Extracción de ADN: ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep (Catálogo 4300)
- Reactivos para PCR: Buffer de reacción 5X, Mix dNTPs, BSA (1:100)

IV.1.3 Enzimas comerciales para realizar la PCR:

- PowerUp™ SYBR® Green Master Mix for qPCR (Thermo Scientific)
- Phire Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific)

IV.1.4 Suministros

- Tubos de microcentrífuga estériles estilo Eppendorf de 0,5–1,5–2,0 ml
- Micropipetas ajustables (0,1–1000 ml)
- Puntas de micropipeta resistentes a aerosoles (0,1–1000 ml)
- Placas y láminas ópticamente transparentes para qPCR 96 pocillos.

IV.2 MÉTODOS

IV.2.1 Selección de determinantes genéticas mediante análisis genómicos comparativos.

Se realizó una revisión bibliográfica exhaustiva a través de servicios de búsqueda especializados como Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), Scirus (<http://www.scirus.com/srsapp/>) y Scopus (<https://www.scopus.com/home.uri>), relacionada con estudios previos de detección de genes de resistencia antimicrobiana en muestras clínicas y ambientales en entornos de producción animal. El análisis genómico comparativo se realizó empleando 8 criterios:

- Criterio 1: Análisis de la prevalencia de DGRA en muestras clínicas y ambientales.
- Criterio 2: Análisis de la prevalencia de DGRA en muestras asociados a la producción animal.
- Criterio 3: DGRA prevalentes en patógenos multirresistentes a antibióticos de importancia prioritaria declarados por la OMS y asociados a la producción animal (OMS, 2021).
- Criterio 4: Clasificación de antibióticos por la OMS (críticamente importante, importancia elevada, importante) (World Health Organization, 2019).
- Criterio 5: Clasificación de antibióticos por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2018).
- Criterio 6: Inclusión en la lista del Sistema Nacional de Monitoreo de Resistencia Antimicrobiana (NARMS) de genes relevantes que confieren resistencia a antibióticos (NARMS, 2023).
- Criterio 7: Inclusión en la lista de la base de datos integral de resistencia a los antibióticos (CARD) de genes relevantes que confieren resistencia a antibióticos (CARD, 2023).
- Criterio 8: Análisis de cocurrencia de DGRA en muestras asociados a la producción animal.

IV.2.2 Análisis de alelos de DGRA

Mediante la utilización de la base de datos de CARD se extrajeron todas las secuencias de los alelos pertenecientes a cada una de las familias de las DGRA seleccionadas en el análisis comparativo. Posteriormente, empleando la herramienta bioinformática MUSCLE se alinearon todas las secuencias alélicas por familia de DGRA y se obtuvo una matriz de identidad para cada familia.

IV.2.3 Análisis de especificidad y cobertura de iniciadores de qPCR.

A través de una búsqueda exhaustiva en la literatura se logró identificar 84 pares de iniciadores de PCR previamente reportados y validados para la amplificación de las familias de DGRA seleccionadas. Se realizó un análisis bioinformático con el objetivo de determinar la cobertura y la especificidad de los diferentes cebadores de PCR utilizando la herramienta bioinformática MEGAX (Kumar et al., 2018) con el fin de alinear las secuencias de los alelos y reconocer la secuencia de los cebadores sentido y anti-sentido y las condiciones apropiadas para realizar el ensayo.

IV.2.4 Diseño de iniciadores de qPCR

Con la utilización de la herramienta PrimerQuestTool disponible en Integrated DNA Technologies (IDT) (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) se diseñaron iniciadores de PCR con el objetivo de lograr una mayor cobertura para la amplificación de cada familia de DGRA. Las bases no coincidentes en cada iniciador fueron alteradas por ambigüedades mediante el uso de código de nucleótidos estandarizado por la IUPAC (PAC, 1995).

IV.2.5 Estandarización y validación de ensayos de qPCR para detección y cuantificación de DGRA.

IV.2.5.1 Material biológico.

1. ADN extraído de aislamientos del cepario del Laboratorio de Microbiología Molecular, FQ/UAQ, de bacterias con el genoma completo secuenciado

que albergaban los genes de resistencia a antibióticos de interés, conservados en glicerol y caldo LB (Cuadro 4).

2. ADN conservado a – 20°C perteneciente al banco de muestras del Laboratorio de Microbiología Molecular, FQ/UAQ.

Cuadro 4. Colección de DGRA en el cepario del Laboratorio de Microbiología Molecular

Colección de DGRA en el cepario del Laboratorio de Microbiología Molecular	
Genes que confieren resistencia a antibiótico	aadA2, aph(3')-Ia-like, blaSHV-12, blaTEM-1B, dfrA18-like, QnrB2, strA, strB, sul1, sul1-like, tet(D), aadA2-like, dfrA12, floR-like, sul2, dfrA14-like, QnrB19, strA-like, tet(A)-like, tet(A), blaCMY-2, blaCARB-2, dfrA16, oqxA, oqxB-like, aac(3)-IVa-like, aadA1, aph(3')-Ic, aph(4)-Ia, blaCTX-M-65, fosA, strB-like, blaCMY-65-like, tet(C)-like, blaCMY-70-like, QnrB71-like, tet(C), cat-like, dfrA1, floR, tet(G), tet(J)-like, blaCMY-74-like, blaCARB-1-like, mph(A), QnrA1
Plásmidos asociados a resistencia a antibióticos	IncHI2A, IncHI2, IncI1, IncN, IncFIB(S), IncFII(S), IncN, IncFIB(S), IncFII(S), IncFIB(pENTAS01), IncFII(pCoo), IncN, IncFIB(K), IncN, IncFIB(pHCM2), IncFIB(pHCM2), IncFII(pMET)

IV.2.5.2 Extracción ADN

Para la extracción de ADN de aislamientos bacterianos, las cepas fueron activadas en caldo de enriquecimiento LB (Luria Broth por sus siglas en inglés), con volúmenes de 5 ml de Caldo LB + 100 µl de aislamiento y se incubaron a 37°C por 24 horas. Posteriormente, se tomó 1 ml del crecimiento obtenido y se realizó el proceso de extracción de ADN utilizando el kit comercial Quick -DNA Miniprep Zymo Research® (Catálogo D3024) con un volumen de elución final de 50 µl. Las extracciones de ADN se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Borowiak et al., 2020). Se evaluó la pureza y concentración del ADN extraído mediante Espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) constatando que sea ADN puro, ideal para el estudio con parámetros A260/A280 > 1,8.

IV.2.5.3 Selección de las temperaturas óptimas de alineación de los iniciadores de qPCR.

Se realizaron gradientes de temperatura de extensión para identificar los parámetros que generaran los mejores productos de la PCR, analizando la intensidad de las bandas que se visualizaron y el tamaño del amplicón que se esperaba. Se realizaron 3 gradientes de temperaturas en dependencia del diseño de los iniciadores de PCR (Cuadro 5) por 30 segundos. Los ensayos de PCR se realizaron utilizando la Taq Polimerasa comercial Phire Hot Start II, bajo las siguientes condiciones: 2 µl de ADN con concentración 5ng/ µl, 3.4 µl buffer de reacción 5X, 0.85 µl BSA con concentración 1:100, 0.34 µl Mix dNTPs concentración 10mM, iniciadores de PCR (forward y reverse) 0.68 µl cada uno con una concentración de 1 µM y 0.34 µl de Taq Polimerasa para un volumen final de 17 µL por reacción. Se empleó el protocolo de PCR previamente estandarizado por el laboratorio: desnaturalización inicial a 95 °C por 1 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 seg, alineación por 30 seg (gradientes de temperatura), extensión a 72 °C por 30 seg y extensión final 72 °C por 2 min. Los productos de la PCR se evaluaron en un gel de agarosa 1.5 %. Cada pozo fue cargado con 5 µl de producto de PCR. Las condiciones de corrida de los geles fueron:

100 V por 25 min, fueron teñidos con bromuro de etidio (10mg/mL) y posteriormente analizados con un fotodocumentador (MiniBis Pro).

Cuadro 5. Gradientes de temperaturas de alineación de iniciadores de PCR utilizados.

Gradiente 1	60°C – 59.3°C – 58.1°C – 56.3°C - 54°C – 52.3°C – 50.9°C - 50°C
Gradiente 2	57.2°C – 56.5°C – 55.4°C – 53.8°C – 51.7°C – 50.2°C – 49°C – 48.2°C
Gradiente 3	63°C – 62.5°C – 61.5°C – 60°C – 58.2°C – 56.9°C – 55.8°C - 55°C

IV.2.5.4 Sensibilidad, Eficiencia y Reproducibilidad.

Se realizaron análisis de las curvas de amplificación de cada DGRA en conjunto con el análisis de las curvas estándar, para esto último se llevaron a cabo diluciones quintuples seriadas (1:5) de ADN de controles positivos con concentraciones conocidas. Mediante la utilización del software del equipo CFX Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) se obtuvieron los resultados de eficiencia del ensayo y valor de r con el objetivo de conocer la linealidad de los resultados.

La reproducibilidad del ensayo se evaluó también con el análisis de las curvas estándar, verificando el valor del ciclo de umbral de amplificación (Ct value). Muestras con la misma concentración de ADN deben de generar un Ct equivalente. Los valores de Ct serán calculados con el software del equipo CFX Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

IV.2.5.5 Especificidad

Para determinar la especificidad del ensayo, se analizaron las curvas de disociación generadas en la amplificación. Se utilizó ADN del cepario del Laboratorio de Microbiología Molecular que se conocía que portaban el gen de interés como controles positivos. La amplificación del gen de interés solo debe de ocurrir en una Tm específica. De esta manera se establece de manera segura que la única

amplificación que se analiza corresponde a la DGRA de interés (Tolosi et al., 2021). La especificidad también se corroborará a través de la secuenciación Sanger de los amplicones obtenidos en la qPCR.

IV.2.6 Implementación de ensayos de qPCR para detección y cuantificación de DGRA

IV.2.6.1 Material biológico

Para la implementación del ensayo se empleó como material biológico muestras clínicas (excretas n = 60) y ambientales (suelos n = 20) pertenecientes al banco de muestras del Laboratorio de Microbiología Molecular, FQ/UAQ, almacenadas a –20°C provenientes de sistemas de producción avícola, bovino y porcino.

IV.2.6.2 Extracción ADN

Para la extracción de ADN de muestras clínicas y ambientales se utilizaron cantidades y volúmenes de muestra previamente estandarizados en el laboratorio, (Cuadro 6). Las muestras se sometieron a un proceso de lisis física utilizando un proceso de pulverización catódica de perlas de sílice (4,000 rpm/45 s) con un homogeneizador comercial (PowerLyzer 24 Bench Top Bead-Based Homogeneizer, MoBio) y posteriormente se realizó la extracción de ADN de utilizando el kit comercial ZymoBIOMICS DNA Miniprep (Catálogo D4300) con un volumen final de 100 µl. Las extracciones de ADN se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Borowiak et al., 2020). Posteriormente se evaluó la pureza y concentración del ADN extraído mediante Espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) constatando que sea ADN puro, ideal para el estudio con parámetros A260/A280 > 1,8.

Cuadro 6. Cantidades y volúmenes empleados para la extracción de ADN ambiental.

Heces	0.2 g
Tejidos	0.2 g
Suelo	0.25 g
Líquidas (superficies)	250 ul

IV.2.6.3 Ensayos de qPCR para la identificación y cuantificación de DGRA en muestras ambientales y clínicas en entornos de producción animal.

Los ensayos de qPCR se llevaron a cabo en un termociclador tiempo real, modelo CFX96 Touch™ (Bio-rad), utilizando la Taq Polimerasa comercial PowerUp™ SYBR® Green Master Mix for qPCR (Thermo Scientific), bajo las siguientes condiciones: 3 µl de ADN con concentración 5 ng/ µl, 6 µl PowerUp™ SYBR® Green Master Mix, 0.48 µl de iniciadores de PCR con concentración de 1 µM y 0.60 µl de BSA diluido 1:100 para un volumen final de 12 µl por reacción. La amplificación se realizó con el siguiente protocolo: UDG activación 50°C por 2 min, desnaturalización inicial y activación de la Taq 95°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización 95 °C por 30 seg, alineación en correspondencia a la estandarización de cada iniciador de qPCR (Cuadro 7) por 30 seg, extensión 72 °C por 30 seg y extensión final 72 °C por 3 min.

IV.2.7 Análisis estadístico

El análisis de las abundancias relativas de los resultados obtenidos en la implementación del ensayo se realizó mediante la prueba estadística ANOVA y Tukey para el análisis de comparaciones múltiples entre los grupos de estudio. El nivel significancia se establecerá con un valor de $\alpha = 0.05$ (Martín, 2012).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1 Identificación de DGRA de importancia en sistemas de producción animal.

Para la identificación de DGRA, se realizó una búsqueda bibliográfica exhaustiva y se identificaron 70 artículos publicados en revistas indexadas, 50% (35/70) de ellas enfocadas a estudios en sistemas de producción animal y el 50% (35/70) restante enfocadas a estudios en hospitales, aguas residuales, plantas de tratamiento de aguas residuales y aire en el periodo comprendido entre 2017 - 2023. El análisis de estos artículos identificó 200 DGRA. El mayor porcentaje de DGRA reportadas confiere resistencia a la familia de antibióticos betalactámicos (19%), seguido de tetraciclinas (14.50%), aminoglucósidos (13.50%) y macrólidos (12%), todos considerados de importancia crítica para humanos y animales (Figura 3).

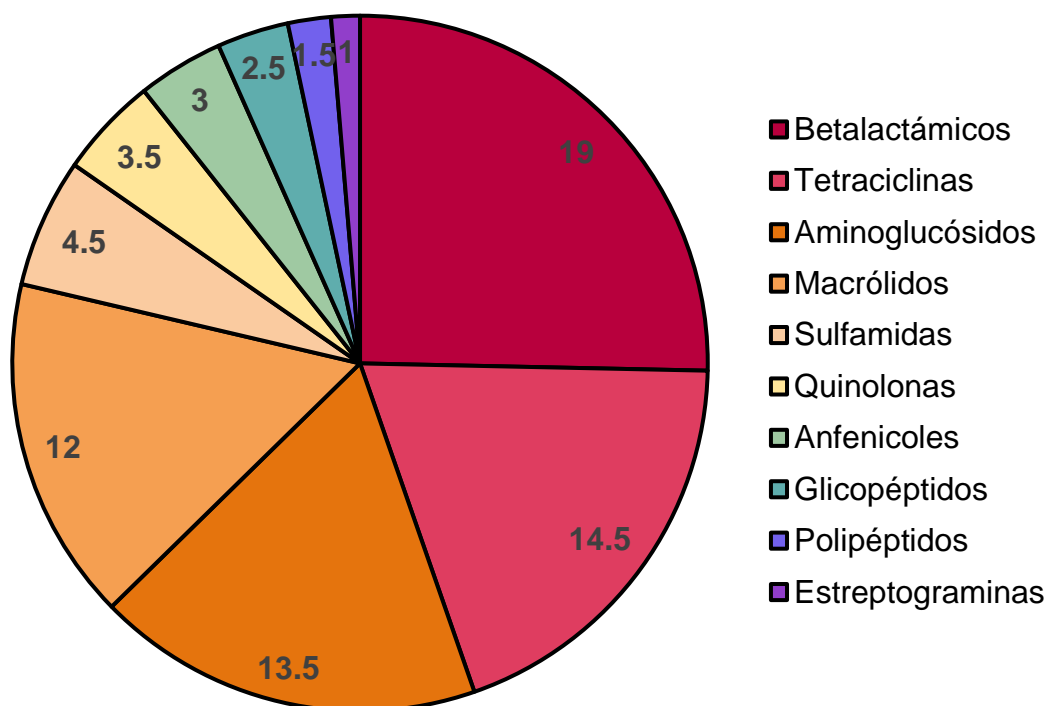


Figura 3. Principales familias de antibióticos analizadas a través de DGRA y descritas en artículos científicos indexados (periodo: 2017 - 2023).

También se observó que la mayoría de las DGRA estudiadas se enfocan a la resistencia de antibióticos de importancia crítica para humanos y animales (Figura 4). El 74% de estas DGRA se encuentran reportadas en la base de datos de CARD, mientras que el 36% en la lista de NARMS; lo que sugiere que estos genes son del interés de autoridades sanitarias enfocadas a la salud humana y animal respectivamente.

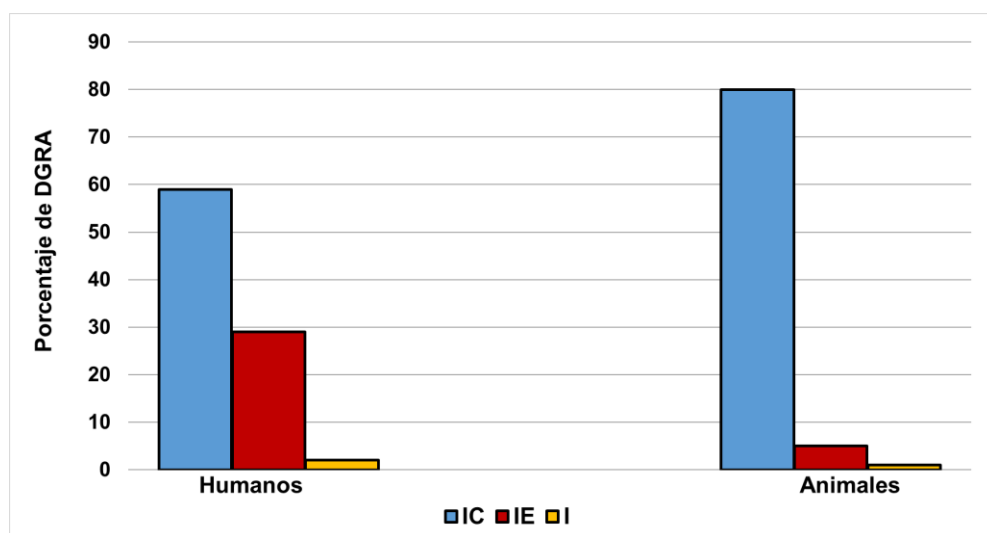


Figura 4. Distribución de las DGRA que confieren resistencia a antibióticos de importancia crítica (IC), importancia elevada (IE) e importantes (I) para humanos y animales.

V.1.2 Evaluación de DGRA por criterios

V.1.2.1 Criterios 1 y 2

Del total de las DGRA identificadas el 82% (164/200) se han reportado en entornos ambientales, mientras que el 49.5% (99/200) se han reportado en entornos de producción animal (Figura 5). Se identificaron 62 DGRA analizados en al menos 3 artículos publicados de un total de 200 DGRA analizadas el mayor porcentaje de las DGRA identificadas se encontraban reportadas de 6 a 5 veces en estudios asociados a ambientes relacionados con plantas de tratamientos de aguas residuales, ambientes asociados a hospitales y aire; mientras que en estudios asociados a

sistemas de producción el mayor porcentaje de DGRA se encontraban reportadas entre 8 y 2 veces (Figura 6). Mediante la realización y análisis de un Diagrama de Venn se obtuvo como resultado que 11 de estas DGRA solo se encontraban asociados a entornos ambientales y 9 se encontraban asociados a entornos de producción animal, mientras que 21 de estas DGRA se encuentran relacionadas a ambos (Figura 7). Todas las DGRA identificadas confieren resistencia a antibióticos de importancia crítica para humanos y animales; estas 21 DGRA se sometieron al resto de los criterios establecidos.

DGRA	Ambientales	Producción animal	DGRA	Ambientales	Producción animal
<i>sul1</i>			<i>qnrS1</i>		
<i>ermB</i>			<i>acrB</i>		
<i>intl1</i>			<i>oqxB</i>		
<i>sul2</i>			<i>oqxA</i>		
<i>TetM</i>			<i>strA</i>		
<i>qnrS</i>			<i>msrE</i>		
<i>tet(W)</i>			<i>ampC</i>		
<i>tet(Q)</i>			<i>mecA</i>		
<i>blaTEM</i>			<i>TetM-01</i>		
<i>ermC</i>			<i>TetM-02</i>		
<i>tet(X)</i>			<i>TetM-03</i>		
<i>blaCTX-M-15</i>			<i>blaTEM_clust</i>		
<i>blaCTX-M-32</i>			<i>blaCTX-M-14</i>		
<i>blaTEM-1</i>			<i>blaCTX-M-1LIKE</i>		
<i>vanA</i>			<i>blaCTX-M9</i>		
<i>tetA</i>			<i>blaOXA-2</i>		
<i>ermF</i>			<i>blaOXA 10</i>		
<i>tetO</i>			<i>tetG</i>		
<i>MCR1</i>			<i>blaSHV-5</i>		
<i>blaCTX-M</i>			<i>intl2</i>		
<i>blaCMY-2</i>			<i>blaCMY</i>		
<i>blaOXA-58</i>			<i>vanB</i>		
<i>blaSHV</i>			<i>blaNDM-1</i>		
<i>blaNDM</i>			<i>blaIMP_clust4</i>		
<i>qnrB</i>			<i>qnrA</i>		
<i>aadA1</i>			<i>qnr-aac(6)-Ib-cr</i>		
<i>aadA</i>			<i>qacED1-01</i>		
<i>qacEdeltaI</i>			<i>blaCTX-M1</i>		
<i>blaOXA-48</i>			<i>lnu (B)</i>		
<i>blaZ</i>			<i>floR</i>		
<i>tetS</i>			<i>blaIMP</i>		
<i>tet(32)</i>			<i>blaampC</i>		
<i>aadA2</i>			<i>blapse1</i>		
<i>strB</i>			<i>blaGES-1</i>		
<i>blaOXA-1</i>			<i>blaVEB</i>		
<i>blaOXA</i>			<i>tetO-01</i>		
<i>tetB</i>			<i>tet(X1)</i>		
<i>blaKPC-3</i>			<i>tet(X2)</i>		
<i>blaKPC</i>			<i>tet(X)_clust</i>		
<i>blaGES</i>			<i>tet(H)</i>		
<i>tetK</i>			<i>tetW-01</i>		
<i>tetL</i>			<i>tetD</i>		
<i>tet(X3)</i>			<i>vanC</i>		
<i>tet(X4)</i>			<i>VanRO</i>		
<i>tetT</i>			<i>VanHOX</i>		
<i>tet(44)</i>			<i>erm(B)_clust</i>		
<i>tet36</i>			<i>erm(F)_clust</i>		
<i>tetBP</i>			<i>ermX</i>		
<i>sul3</i>			<i>ErmO</i>		
<i>ermA</i>			<i>mcr-2</i>		

Figura 5. DGRA identificadas en estudios ambientales y de producción animal.

DGRA	Ambientales		Producción animal		DGRA	Ambientales		Producción animal	
<i>qnrD</i>					<i>dldHA2X</i>				
<i>qnrB4</i>					<i>ereA</i>				
<i>emrR</i>					<i>lsa(E)</i>				
<i>emrD</i>					<i>iri</i>				
<i>aadA_clust1</i>					<i>marA</i>				
<i>aadA_ant(3')-la</i>					<i>korB</i>				
<i>aadA2-01</i>					<i>murA</i>				
<i>aadA2-02</i>					<i>mphA</i>				
<i>aadA2-03</i>					<i>mexT</i>				
<i>aadA5</i>					<i>ole(C)</i>				
<i>aaC</i>					<i>ramR</i>				
<i>aacA-aphD</i>					<i>otr(A)</i>				
<i>aph(3')-Ib</i>					<i>oprD</i>				
<i>aph(6)-Id</i>					<i>oprJ</i>				
<i>APH(3)-Ia</i>					<i>blaCTX-M2</i>				
<i>AAC(3)-VIIa</i>					<i>tetC</i>				
<i>AAC-VIIIa</i>					<i>mefA</i>				
<i>dfrB3</i>					<i>aac-(6)-Ib</i>				
<i>dfrB7</i>					<i>aph(3')-III</i>				
<i>dfrA1</i>					<i>blaOXA-51</i>				
<i>dfrA1-02</i>					<i>sulA</i>				
<i>dfrC</i>					<i>VEB-1</i>				
<i>tnpA-01</i>					<i>bcrA</i>				
<i>tnpA-04</i>					<i>bcrB</i>				
<i>tnpA-06</i>					<i>bcrR</i>				
<i>tnpA-07</i>					<i>vat(D)</i>				
<i>tnpA02</i>					<i>blaCTX-cml_e3</i>				
<i>tnpA</i>					<i>blaOXA-4</i>				
<i>qacED1-02</i>					<i>vat(E)</i>				
<i>qacH</i>					<i>ant2ia</i>				
<i>qacA</i>					<i>ant3ia</i>				
<i>AcrS</i>					<i>aph3ia</i>				
<i>acrR</i>					<i>aph3iia</i>				
<i>acrA</i>					<i>aphi6a</i>				
<i>acrD</i>					<i>cpe</i>				
<i>lnuA</i>					<i>cmxA</i>				
<i>msr(D)</i>					<i>ereB</i>				
<i>msrA</i>					<i>pcoA</i>				
<i>rphA</i>					<i>pcoC</i>				
<i>rphB</i>					<i>pcoD</i>				
<i>ISPps</i>					<i>vga (A)</i>				
<i>IS26</i>					<i>vgb(A)</i>				
<i>mef(A)-3</i>					<i>ermT</i>				
<i>mef(A)-clust</i>					<i>mefC</i>				
<i>cmIA</i>					<i>mphC</i>				
<i>cfxA_clust</i>					<i>mphG</i>				
<i>CFxA6</i>					<i>cat I</i>				
<i>clint1</i>					<i>plc</i>				
<i>CRP</i>					<i>rarD</i>				
<i>cpxA</i>									

Continuación Figura 5. DGRA identificadas en estudios ambientales y de producción animal.

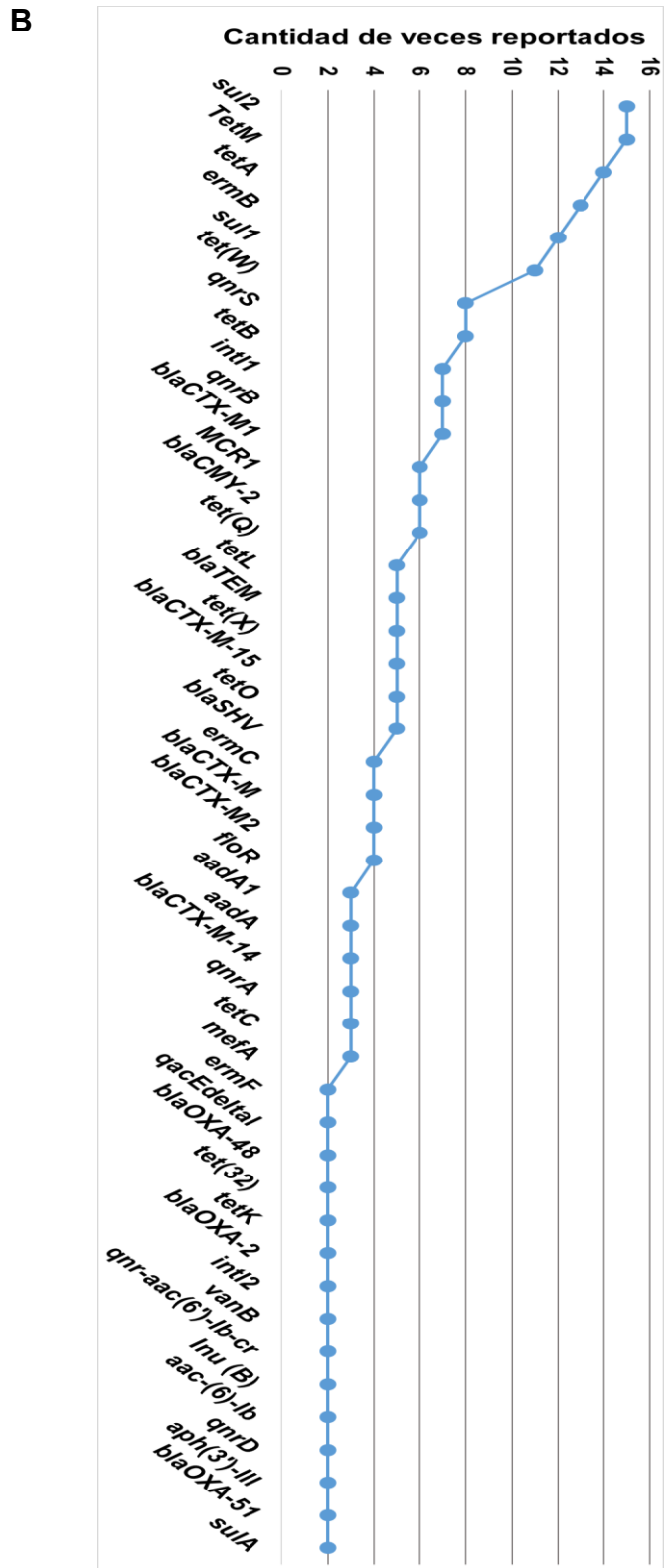
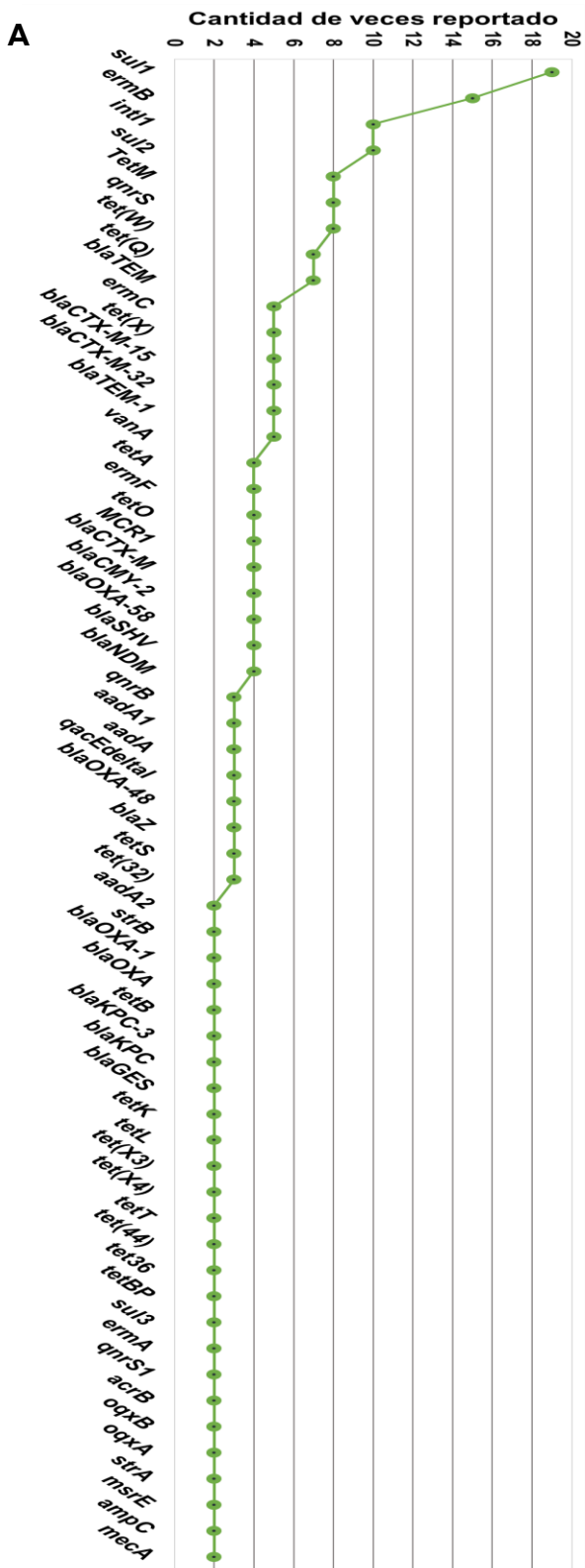


Figura 6. Número de reportes de las diferentes DGRA identificadas. A) estudios ambientales. B) entornos de producción animal.

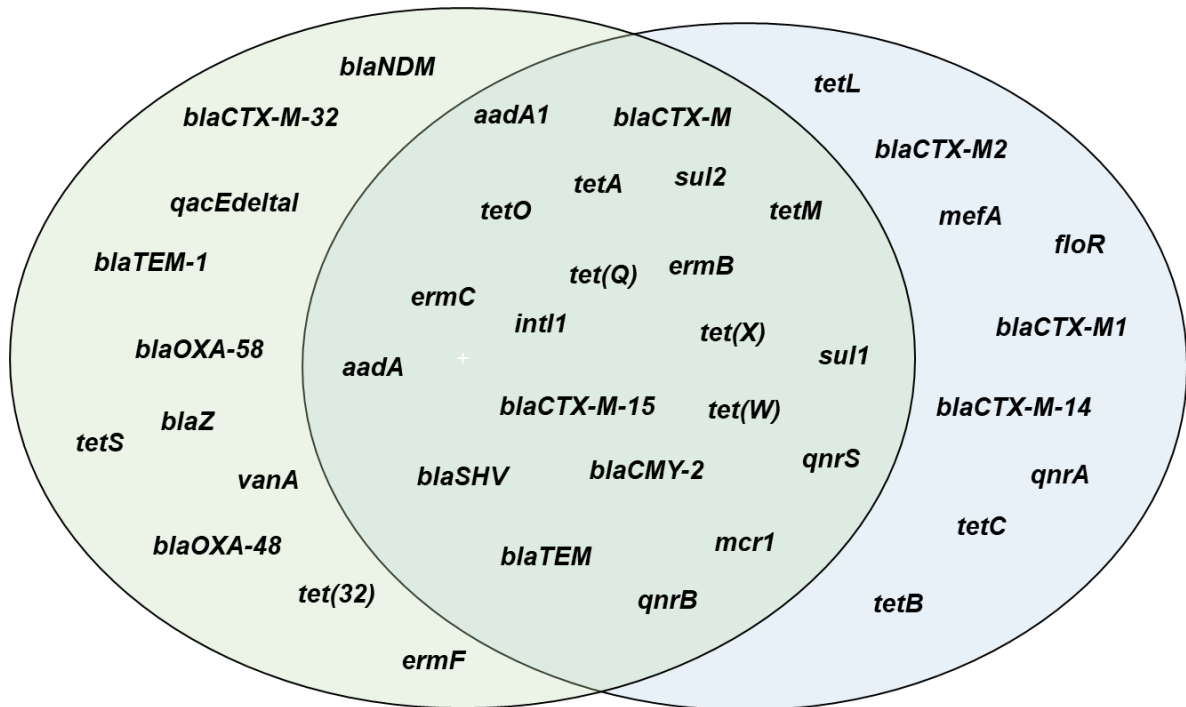


Figura 7. DGRA más comunes en entorno ambiental, sistemas de producción animal y ambos.

V.1.2.2 Criterio 3

De las 21 DGRA cocurrentes en estudios ambientales y sistemas de producción animal, el 86% (18/21) se encuentran relacionadas con al menos 3 patógenos de importancia clínica: *Enterococcus faecium*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Campylobacter spp.* y *Shigella spp.*, el 10% se encuentran asociadas a 2 patógenos y del 14% de estas DGRA no se encontró asociación con ninguno de estos patógenos de importancia; estos resultados los podemos observar en la figura 8 donde la relación de estas DGRA con cada uno de los patógenos de importancia se evidencia mediante un sombreado en verde (Figura 8). Estos patógenos han sido identificados como las principales causas de mortalidad por bacterias resistentes a antibióticos (Lancet, 2019). Luego de la evaluación mediante este criterio se seleccionaron 18 DGRA, las cuales se sometieron al resto de los criterios.

	Enterococcus faecium	Salmonella spp	E. coli	Campylobacter spp	Shigella spp
<i>Sul2</i>					
<i>tetM</i>					
<i>ermB</i>					
<i>Sul1</i>					
<i>Tet(W)</i>					
<i>qnrS</i>					
<i>tetA</i>					
<i>intl1</i>					
<i>Mcr1</i>					
<i>qnrB</i>					
<i>blaCMY-2</i>					
<i>Tet(X)</i>					
<i>blaTEM</i>					
<i>Tet(Q)</i>					
<i>blaCTX-M-15</i>					
<i>tetO</i>					
<i>blaSHV</i>					
<i>ermC</i>					
<i>blaCTX-M</i>					
<i>aadA1</i>					
<i>aadA</i>					

Figura 8. DGRA relacionadas con patógenos multirresistentes de importancia.

V.1.2.3 Criterios 4 y 5

Las 18 DGRA evaluadas confieren resistencia a antibióticos de importancia crítica en animales, mientras que en humanos 7/18 confieren resistencia antibióticos de importancia elevada y 11/18 a antibióticos de importancia crítica (Figura 9). Debido a que para las instituciones de salud internacionales es prioritario vigilar la resistencia a antibióticos de importancia crítica y elevada, las 18 DGRA serán seleccionados para evaluaciones posteriores.

	Clasificación antibióticos OMS			Clasificación antibióticos OMSA		
	IC	IE	I	IC	IE	I
<i>Sul2</i>		■		■		
<i>tetM</i>		■		■		
<i>ermB</i>	■			■		
<i>Sul1</i>		■		■		
<i>Tet(W)</i>		■		■		
<i>qnrS</i>	■			■		
<i>tetA</i>		■		■		
<i>qnrB</i>	■			■		
<i>blaCMY-2</i>	■			■		
<i>Tet(Q)</i>		■		■		
<i>blaTEM</i>	■			■		
<i>blaCTX-M-15</i>	■			■		
<i>tetO</i>		■		■		
<i>blaSHV</i>	■			■		
<i>ermC</i>	■			■		
<i>blaCTX-M</i>	■			■		
<i>aadA1</i>	■			■		
<i>aadA</i>	■			■		

IC: Importancia crítica
IE: Importancia elevada
I: Importante

Figura 9. Clasificación de antibióticos a los cuales las DGRA identificadas confieren resistencia.

V.1.2.4 Criterios 6 y 7

Las 18 DGRA se encuentran incluidas en las bases de datos de resistencia a antibióticos CARD (Figura 10). La presencia de estos genes en la base de datos CARD indica que son mecanismos de resistencia validados, clasificados correctamente y de importancia en salud pública (Alcock et al., 2023). También las 18 DGRA seleccionadas se encuentran en la base de datos de NARMS (Figura 10); un mecanismo de vigilancia epidemiológica en sistemas comerciales de producción animal, la NARMS registra bacterias y genes de resistencia de mayor prevalencia e importancia para la salud pública (Tate et al., 2021). La presencia de las DGRA en las 2 bases de datos reafirma la necesidad de vigilar la prevalencia y diversidad de estos genes en ambientes y sistemas de producción animal.

	NARMS	CARD
<i>sul2</i>		
<i>TetM</i>		
<i>ermB</i>		
<i>sul1</i>		
<i>tet(W)</i>		
<i>qnrS</i>		
<i>tetA</i>		
<i>qnrB</i>		
<i>blaCMY-2</i>		
<i>tet(Q)</i>		
<i>blaTEM</i>		
<i>blaCTX-M-15</i>		
<i>tetO</i>		
<i>blaSHV</i>		
<i>ermC</i>		
<i>blaCTX-M</i>		
<i>aadA1</i>		
<i>aadA</i>		

NARMS: Sistema Nacional de Monitoreo de Resistencia Antimicrobiana

CARD: Base de datos integral de resistencia a los antibióticos

Figura 10. Presencia de DGRA en sistemas y bases de datos de monitoreo de resistencia.

V.1.2.5 Criterio 8

El análisis de cocurrencia realizado mediante un HeapMap entre las 18 DGRA evidenció que existe una falta de consenso en estudios de detección y cuantificación de genes de resistencia; sin embargo, se revelaron 2 perfiles de resistencia principales: i) tetraciclinas, macrólidos y sulfamidas, ii) betalactámicos y quinolonas. En el 15% de las publicaciones analizadas se encontró cocurrencia entre *tetA* y *ermB* al igual que *ermB* y *sul2*; seguido de *tetQ* y *tetW* con un 13%; *tetA*, *sul1* y *tetM* con un 12%; *sul1*, *ermB* y *tetW* con 10% y con un 7% *blaSHV*, *qnrB* y *qnrS* así como *blaCMY-2* y *blaSHV* respectivamente (Figura 11).

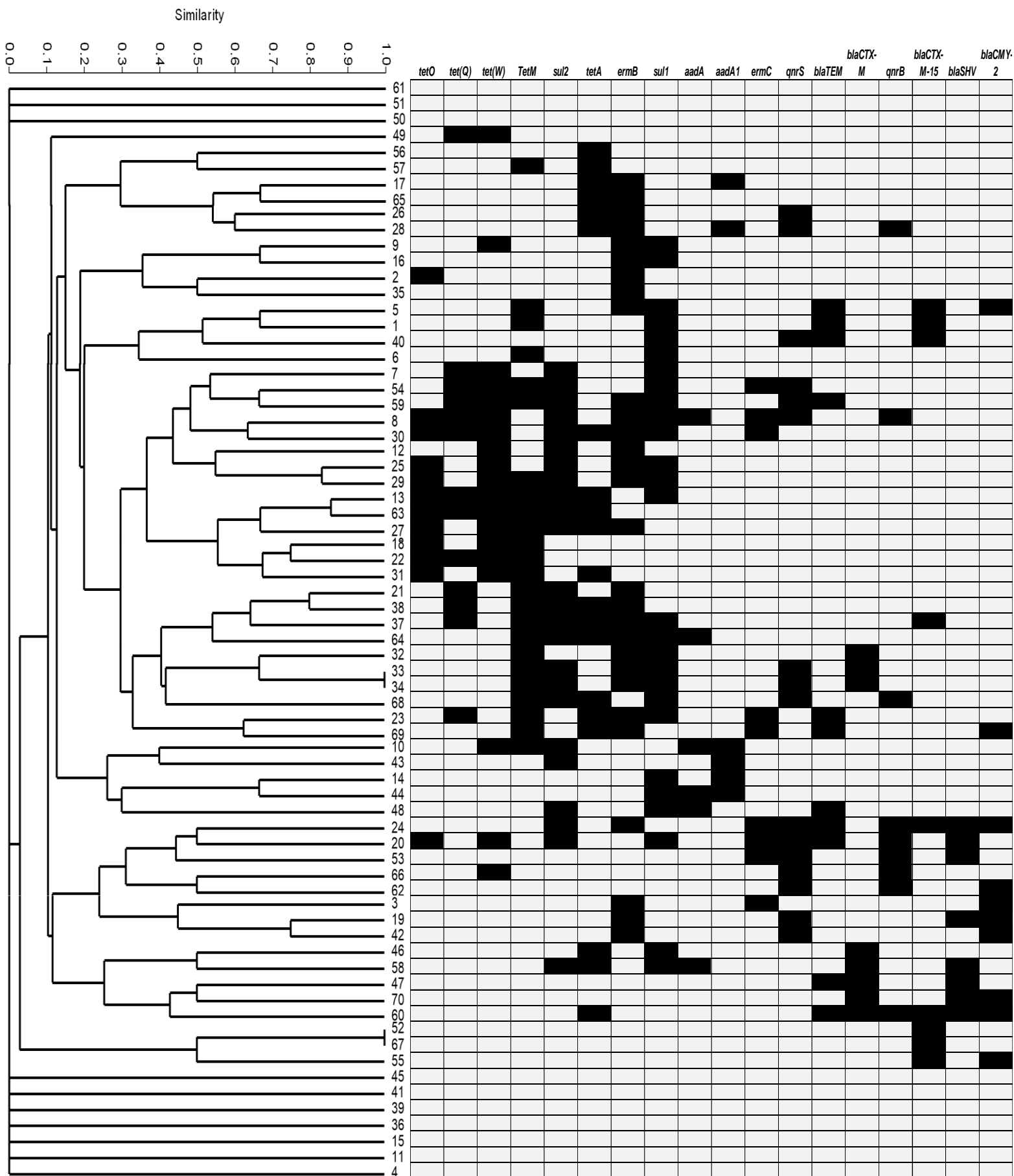


Figura 11. Análisis de cocurrencia de las DGRA seleccionadas.

Se seleccionaron 18 DGRA de mayor importancia en los sistemas de producción animal (Cuadro 7); de estos 5/18 pertenecen a la familia *tet*, 5/18 pertenecen a la familia *bla* y 2/18 pertenecen a las familias *erm*, *sul*, *qnr* y *aadA* respectivamente. Los 5 alelos de la familia *bla*, pertenecen a las subfamilias *blaCTX-M*, *blaSHV*, *blaTEM* y *blaCMY*. Los 2 alelos de la familia *qnr* pertenecen a las subfamilias *qnrB* y *qnrS*.

Cuadro 7. DGRA identificadas de mayor importancia en sistemas de producción animal.

Familia DGRA	Alelos
<i>tet</i>	<i>tetM, tetO, tet(W), tetA, tet(Q)</i>
<i>bla</i>	<i>blaCTX-M, blaCTX-M15, blaCMY-2, blaTEM, blaSHV</i>
<i>erm</i>	<i>ermB, ermC</i>
<i>sul</i>	<i>sul1, sul2</i>
<i>qnr</i>	<i>qnrB, qnrS</i>
<i>aadA</i>	<i>aadA, aadA1</i>

También se seleccionó por su importancia en salud pública la subfamilia *blaOXA* perteneciente a la familia *bla* (OIE, 2018; (World Health Organization, 2019).

V.2 Diversidad de alelos por familia de DGRA

Con el objetivo de desarrollar iniciadores de PCR que identifiquen todos los alelos pertenecientes a las familias seleccionadas, se identificó la diversidad de secuencias entre los miembros de cada familia. El análisis bioinformático en la base de datos CARD identificó un total de 1,943 alelos pertenecientes a las 6 familias seleccionadas; entre cada familia de DGRA, la secuencia de nucleótidos tuvo un porcentaje de identidad que varió desde 23% hasta 100% (Cuadro 8).

Cuadro 8. Base de datos de DGRA y porcentaje de identidad entre familias de DGRA.

Familia DGRA	No. Alelos identificados CARD	% ID
<i>aadA</i>	25	44.0 - 100
<i>bla</i>	1,712	23.0 - 100
<i>qnr</i>	97	46.5 - 100
<i>tet</i>	60	23.3 - 100
<i>erm</i>	45	23.4 - 100
<i>sul</i>	4	48.2 - 100

V.3 Análisis familia *aadA*

La familia de genes *aadA* codifican para enzimas modificadoras de aminoglucósidos O-nucleotidiltransferasas (ANT), específicamente ANT(3'')-Ia (Ramirez & Tolmasky, 2010). Las identidades entre las 25 secuencias con actividad ANT(3'') de la familia *aadA* es mayor al 43% (Stern et al., 2018). La nomenclatura de estos alelos es con el símbolo *aadA* y números consecutivos del 1 al 25 (ej. *aadA1*, *aadA5*, *aadA10*, *aadA25*).

V.3.1 Identificación, análisis y diseño de iniciadores de PCR

En el caso de la familia *aadA* se identificaron en la literatura iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de la mayoría de los miembros de la familia. Se analizaron un total de 3 iniciadores los cuales cuentan con una cobertura de 78.5%, 77.8% y 32%; respectivamente. Estos resultados indican la necesidad de diseñar nuevos iniciadores de PCR para aumentar la cobertura de los miembros de la familia. En el presente estudio se diseñó un par de iniciadores de PCR con una cobertura de 85.2% y 24.4% de degeneración (Cuadro 9).

Cuadro 9. Iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de la familia *aadA*.

Familia	Objetivo de amplificación	Miembros	No. iniciador	Cobertura (%)	Referencia
<i>aadA</i>	Familia <i>aadA</i>	25	1	85.2	Presente estudio
<i>aadA</i>	Familia <i>aadA</i>	25	2	78.5	(Akhtardanesh et al., 2016)
<i>aadA</i>	Familia <i>aadA</i>	25	3	77.8	(Kozak et al., 2009)
<i>aadA</i>	Familia <i>aadA</i>	25	4	32	(Inuwa et al., 2022)

V.4 Análisis familia *bla*

La familia *bla* comprende alrededor de 8 subfamilias, de las cuales, CTX-M, OXA, SHV, TEM y CMY se seleccionaron mediante los 8 criterios establecidos. A nivel de secuencias de aminoácidos TEM y SHV, comparten 67% de identidad, sin embargo, CTX-M solo comparte un 40% de identidad con ambas subfamilias. CTX-M se subdivide en 5 clúster, CTX-M-1/3, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25, el porcentaje de similitud entre las secuencias de nucleótidos de este clúster varía entre el 79% y 90%. La subfamilia OXA es la más diversa con más de 900 alelos y solamente un 20% de homología entre los mismos. Esta familia está dividida en 40 grupos, donde el % de identidad entre los miembros de cada grupo varía entre el 40% y 100% (Bush et al., 1995; Gutkind et al., 2013). Los grupos de la familia *blaOXA* de mayor prevalencia en entornos de producción animal son *blaOXA-2_like* y *blaOXA-10_like* (Asgin et al., 2019) y uno de los grupos de mayor prevalencia y preocupación para la salud pública es *blaOXA-48_like*. Debido a la variabilidad genética de los miembros de la familia *bla*, se propone el estudio de estos genes a nivel de subfamilias (Cuadro 10).

Cuadro 10. Base de datos de DGRA y porcentaje de identidad de subfamilias *bla*.

Subfamilias DGRA	No. Alelos identificados CARD	% ID
<i>blaSHV</i>	199	98.2 - 100
<i>blaTEM</i>	202	96.2 - 100
<i>blaCTX-M</i>	231	61.7 - 100
<i>blaCMY</i>	165	55.8 - 100
<i>blaOXA</i>	915	23.0 – 100

V.4.1 Identificación, análisis y diseño de iniciadores de PCR

Para la familia *bla*, se identificaron en la literatura iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de la mayoría de los alelos pertenecientes a las subfamilias *blaTEM* (Cuadro 11), *blaSHV* (Cuadro 12) y *blaCMY* (Cuadro 13), con un rango de cobertura que varió entre un 0.50% y 98.51%. En el caso de las subfamilias *blaOXA* y *blaCTX-M*, los iniciadores reportados van dirigidos a los grupos determinados en cada subfamilia (Cuadro 14 y 15) con coberturas entre 2.95% y 87.50%. Debido a los bajos porcentajes de cobertura observados para algunas familias, se desarrollaron nuevos iniciadores de PCR.

En el presente estudio se diseñaron iniciadores de PCR enfocados a la amplificación de las subfamilias *blaCTX-M*, *blaTEM*, *blaSHV* y *blaCMY*. Para *blaTEM* y *blaSHV* los iniciadores de PCR tuvieron un 100% de cobertura; los iniciadores diseñados para la amplificación de los miembros de la subfamilia *blaTEM* fueron modificados del estudio de Deccache y col. en el 2015 (Deccache et al., 2015). En el caso de *blaCTX-M* la cobertura de los iniciadores diseñados fue de 95.7%. El diseño de los iniciadores de *blaOXA* se orientó a la amplificación de los grupos *blaOXA-2_like*, *blaOXA-10_like* y *blaOXA-48_like*, los iniciadores cuentan con una cobertura de 92.9% (Cuadro 15).

Cuadro 11. Iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de la subfamilia *blaTEM*.

Familia	Objetivo de amplificación	Total alelos	No. iniciador	Cobertura (%)	Referencia
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaTEM</i>	202	1	100	Presente estudio
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaTEM</i>	202	2	98.51	(Deccache et al., 2015)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaTEM</i>	202	3	98.51	(Chen et al., 2020a)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaTEM</i>	202	4	98.51	(Jarma et al., 2021)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaTEM</i>	202	5	98.02	(Macedo et al., 2020)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaTEM</i>	202	6	98.02	(Zhu et al., 2021a)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaTEM</i>	202	7	97.03	(Werner et al., 2023)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaTEM</i>	202	8	89.60	(Aleem et al., 2021)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaTEM</i>	202	9	59.41	(Salah et al., 2019)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaTEM</i>	202	10	58.31	(Effendi et al., 2022)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaTEM</i>	202	11	40.36	(Ejaz et al., 2021)

Cuadro 12. Iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de la subfamilia *blaSHV*.

Familia	Objetivo de amplificación	Total alelos	No. iniciador	Cobertura (%)	Referencia
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaSHV</i>	199	1	100	Presente estudio
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaSHV</i>	199	2	94.97	(Ye et al., 2023)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaSHV</i>	199	3	94.97	(Deccache et al., 2015)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaSHV</i>	199	4	94.47	(Salah et al., 2019)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaSHV</i>	199	5	93.67	(Aleem et al., 2021)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaSHV</i>	199	6	86.43	(Schmidt et al., 2015)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaSHV</i>	199	7	79.40	(Hæggman et al., 2004)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaSHV</i>	199	8	78.84	(Ly et al., 2019)
<i>Bla</i>	Subfamilia <i>blaSHV</i>	199	9	31.66	(Hanson et al., 1999)

Continuación Cuadro 12. Iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de la subfamilia *blaSHV*.

<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaSHV</i>	199	10	5.53	(Werner et al., 2023)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaSHV</i>	199	11	0.50	(Wang et al., 2022)

Cuadro 13. Iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de la subfamilia *blaCMY*.

Familia	Objetivo de amplificación	Total alelos	No. iniciador	Cobertura (%)	Referencia
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaCMY</i>	165	1	94.60	Presente estudio
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaCMY</i>	165	2	68.48	(Moffat et al., 2020)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaCMY</i>	165	3	63.64	(Iweriebor et al., 2015)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaCMY</i>	165	4	62.30	(Mohamed et al., 2022)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaCMY</i>	165	5	50.46	(Kozak et al., 2009)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaCMY</i>	165	6	48.48	(Alexander et al., 2020)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaCMY</i>	165	7	1.82	(Folster et al., 2014)

Cuadro 14. Iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de la familia subfamilia *blaCTX-M*.

Familia	Objetivo de amplificación	Total alelos	No. iniciador	Cobertura (%)	Referencia
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaCTX-M</i>	231	1	95.70	Presente estudio
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaCTX-M</i>	231	2	46.32	(Pallares-Vega et al., 2019)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaCTX-M</i>	231	3	28.57	(Henriques et al., 2006)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaCTX-M</i>	231	4	28.57	(Aleem et al., 2021)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaCTX-M</i>	231	5	25.40	(Liu et al., 2021)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaCTX-M</i>	231	6	20.30	(Vinueza-Burgos et al., 2019)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>blaCTX-M</i>	231	7	20	(Taitt et al., 2017)

Continuación Cuadro 14. Iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de la familia subfamilia *bla*CTX-M.

<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> CTX-M Clúster CTX-M-1/3	106	1	100	(Keenum et al., 2022)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> CTX-M Clúster CTX-M-1/3	106	2	99.06	(Pitout et al., 2004)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> CTX-M Clúster CTX-M-1/3	106	3	97.17	(Carattoli et al., 2008)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> CTX-M Clúster CTX-M-2	27	1	88.89	(Vinueza-Burgos et al., 2019)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> CTX-M Clúster CTX-M-2	27	2	81.48	(Vounba et al., 2019)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> CTX-M Clúster CTX-M-2	27	3	77.78	(Pitout et al., 2004)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> CTX-M Clúster CTX-M-8/25	30	1	43.33	(Vounba et al., 2019)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> CTX-M Clúster CTX-M-8/25	30	2	10	(Pitout et al., 2004)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> CTX-M Clúster CTX-M-9	64	1	100	(Vinueza-Burgos et al., 2019)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> CTX-M Clúster CTX-M-9	64	2	100	(Vounba et al., 2019)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> CTX-M Clúster CTX-M-9	64	3	98.76	(Pitout et al., 2004)

Cuadro 15. Iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de la subfamilia *bla*OXA.

Familia	Objetivo de amplificación	Total alelos	No. iniciador	Cobertura (%)	Referencia
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> OXA Grupos <i>OXA-2_like</i> , <i>OXA-10_like</i> , <i>OXA-48_like</i>	92	1	92.90	Presente estudio
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> OXA	915	1	2.95	(Aleem et al., 2021)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> OXA Grupo <i>OXA-2_like</i>	30	1	66.66	(Henriques et al., 2006)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> OXA Grupo <i>OXA-2_like</i>	30	2	56.67	(Khan et al., 2019)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> OXA Grupo <i>OXA-2_like</i>	30	3	53.33	(Asgin et al., 2019)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> OXA Grupo <i>OXA-2_like</i>	30	4	53.33	(Abd El-Baky et al., 2020)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> OXA Grupo <i>OXA-10_like</i>	57	1	70.18	(Henriques et al., 2006)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> OXA Grupo <i>OXA-10_like</i>	57	2	66.66	(Pakbaten Toupanlou et al., 2015)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> OXA Grupo <i>OXA-10_like</i>	57	3	38.60	(Asgin et al., 2019)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> OXA Grupo <i>OXA-10_like</i>	57	4	38.60	(Abd El-Baky et al., 2020)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> OXA Grupo <i>OXA-1_like</i>	12	1	75	(Speldooren et al., 1998)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> OXA Grupo <i>OXA-1_like</i>	12	2	58.33	(Henriques et al., 2006)

Continuación Cuadro 15. Iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de la subfamilia *bla*OXA.

<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> OXA Grupo OXA-1_like	12	3	56.44	(Colom et al., 2003)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> OXA Grupo OXA-23_like	46	1	84.78	(Woodford et al., 2006)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> OXA Grupo OXA-23_like	46	2	82.61	(Yang & Rui, 2016)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> OXA Grupo OXA-23_like	46	3	84.78	(Asgin et al., 2019)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> OXA Grupo OXA-24_like	12	1	83.33	(Yang & Rui, 2016)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> OXA Grupo OXA-24_like	12	2	75.00	(Vounba et al., 2019)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> OXA Grupo OXA-24_like	12	3	72.64	(Woodford et al., 2006)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> OXA Grupo OXA-51_like	374	1	77.54	(Yang & Rui, 2016)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> OXA Grupo OXA-51_like	374	2	77.00	(Woodford et al., 2006)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> OXA Grupo OXA-51_like	374	3	10.70	(Asgin et al., 2019)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> OXA Grupo OXA-58_like	8	1	87.50	(Woodford et al., 2006)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> OXA Grupo OXA-58_like	8	2	50.06	(Yang & Rui, 2016)
<i>bla</i>	Subfamilia <i>bla</i> OXA Grupo OXA-58_like	8	3	37.50	(Asgin et al., 2019)

V.5 Análisis familia *qnr*

Dentro de la familia *qnr* se encuentran 5 subfamilias *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrD* y *qnrC*. El porcentaje de similitud entre los miembros de cada subfamilia varía entre un 80% y 99% (Cuadro 16). En el presente trabajo se seleccionaron las subfamilias *qnrS* y *qnrB* para el desarrollo del estudio.

Cuadro 16. Base de datos de DGRA y porcentaje de identidad por subfamilias *qnr*.

Subfamilias DGRA	No. Alelos identificados CARD	% ID
<i>qnrB</i>	74	80.3 - 100
<i>qnrS</i>	13	89.5 - 100
<i>qnrA</i>	7	93.6 - 100
<i>qnrD</i>	2	99.1 - 100
<i>qnrC</i>	1	100

V.5.1 Identificación, análisis y diseño de iniciadores de PCR

Se identificaron en la literatura iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de las subfamilias *qnrS* y *qnrB*. Los iniciadores identificados tuvieron una cobertura entre el 33.78% - 92.30%. En el presente trabajo se desarrolló un par de iniciadores de PCR capaces de amplificar las 2 subfamilias en una sola reacción con un porcentaje de cobertura de 79.31% (Cuadro).

Cuadro 17. Iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de las subfamilias *qnrS* y *qnrB*.

Familia	Objetivo de amplificación	Total alelos	No. iniciador	Cobertura (%)	Referencia
<i>qnr</i>	Subfamilias <i>qnrS</i> , <i>qnrB</i>	87	1	79.3	Presente estudio
<i>qnr</i>	Subfamilia <i>qnrS</i>	13	1	92.30	(Salah et al., 2019)
<i>qnr</i>	Subfamilia <i>qnrS</i>	13	2	92.30	(Tolosi et al., 2021)
<i>qnr</i>	Subfamilia <i>qnrS</i>	13	3	86.31	(Zhu et al., 2021b)
<i>qnr</i>	Subfamilia <i>qnrB</i>	74	1	62.16	(Cheng et al., 2013)
<i>qnr</i>	Subfamilia <i>qnrB</i>	74	2	33.78	(Salah et al., 2019)
<i>qnr</i>	Subfamilia <i>qnrB</i>	74	3	33.78	(Cheng et al., 2021)

V.6 Análisis familia *tet*

La familia de genes *tet* confieren resistencia a tetraciclinas mediante 3 diferentes mecanismos: bombas eflujo, protección ribosomal e inactivación enzimática (Levy et al., 1999). Debido a la variabilidad que presentan las secuencias de nucleótidos de los miembros de esta familia, es necesario el estudiar cada alelo de esta familia empleando como enfoque principal el mecanismo de resistencia al cual se encuentra relacionado. El porcentaje de identidad por mecanismo de acción varía entre 28.1% y 100% (Cuadro 18). En el presente trabajo se seleccionaron los alelos *tetA*, *tetO*, *tetM*, *tetW* y *tetQ* que son los de mayor importancia en sistemas de producción animal.

Cuadro 18. Porcentaje de identidad de genes que confieren resistencia a tetraciclinas por mecanismo de acción.

Mecanismo de resistencia	Alelos	No. Alelos	% ID
Protección ribosomal	<i>tet(O), tet(M), tet(S), tet(Q), tet(T), tet(W), tetB(P), otr(A), tet, tet(32) tet(36).</i>	11	46.9 - 100
Bombas eflujo	<i>tet(A), tet(B), tet(C), tet(D), tet(E), tet(G), tet(H), tet(I), tet(J), tet(K), tet(L), tet(Y), tet(30), tet(31), tet(34), tet(35), tet(39), tetA(P), tet(V), tet(Z), tet(33), tcr3, otr(B), otr(C)</i>	24	54.6 - 100
Inactivación enzimática	<i>tet(X) tet (34), tet(37)</i>	3	28.1 - 100

V.6.1 Identificación, análisis y diseño de iniciadores de PCR

Se identificaron en la literatura iniciadores de PCR para la amplificación de los alelos seleccionados. Los iniciadores identificados presentaron una cobertura del 100%. En el presente trabajo se diseñaron iniciadores de PCR para la amplificación de los alelos seleccionados por mecanismo de acción, ambos iniciadores contaron con un 100% de cobertura (Cuadro 19).

Cuadro 19. Iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de alelos *tetA*, *tetO*, *tetM*, *tetW* y *tetQ*

Familia	Objetivo de amplificación	Total alelos	No. iniciador	Cobertura (%)	Referencia
<i>tet</i>	Mecanismo protección ribosomal	4	1	100	Presente estudio
<i>tet</i>	Mecanismo bombas eflujo	1	1	100	Presente estudio
<i>tet</i>	Variante <i>tetA</i>	1	1	100	(Keenum et al., 2022)
<i>tet</i>	Variante <i>tetA</i>	1	2	100	(Zhu et al., 2021b)
<i>tet</i>	Variante <i>tetA</i>	1	3	100	(Iweriebor et al., 2015)
<i>tet</i>	Variante <i>tetA</i>	1	4	100	(Keenum et al., 2022)
<i>tet</i>	Variante <i>tetO</i>	1	1	100	(Böckelmann et al., 2009)
<i>tet</i>	Variante <i>tetO</i>	1	2	100	(Inuwa et al., 2022)
<i>tet</i>	Variante <i>tetO</i>	1	3	100	(Woźniak-Biel et al., 2019)
<i>tet</i>	Variante <i>tetO</i>	1	4	100	(Benites et al., 2022)
<i>tet</i>	Variante <i>tetM</i>	1	1	100	(Alexander et al., 2020)
<i>tet</i>	Variante <i>tetM</i>	1	2	100	(Crossette et al., 2021)
<i>tet</i>	Variante <i>tetM</i>	1	3	100	(Kampouris et al., 2021)
<i>tet</i>	Variante <i>tetM</i>	1	4	100	(P. Chen et al., 2020b)
<i>tet</i>	Variante <i>tetW</i>	1	1	100	(Inuwa et al., 2022)
<i>tet</i>	Variante <i>tetW</i>	1	2	100	(Schmidt et al., 2015)
<i>tet</i>	Variante <i>tetW</i>	1	3	100	(Macedo et al., 2020)
<i>tet</i>	Variante <i>tetQ</i>	1	1	100	(Di Francesco et al., 2021)
<i>tet</i>	Variante <i>tetQ</i>	1	2	100	(Cadena et al., 2018)
<i>tet</i>	Variante <i>tetQ</i>	1	3	100	(Beheshti et al., 2020)
<i>tet</i>	Variante <i>tetQ</i>	1	4	100	(Abdi Hachesoo et al., 2014)

V.7 Análisis familia *erm*

La familia *erm* se encuentra clasificada en 21 clases: A, B, C, D, E, F, G, H, I, N, O, Q, R, S, T, U, V, W, X, Y y Z, que codifican a metilasas específicas. La clase más distante es la clase A y clase O con un 83% y 84% de homología de nucleótidos respectivamente. El resto de las clases poseen más de 97% de homología de secuencias de nucleótidos (M. C. Roberts et al., 1999). Para el presente estudio se seleccionaron las variantes *ermC* y *ermB*, de mayor importancia en sistemas de producción animal.

V.7.1 Identificación, análisis y diseño de iniciadores de PCR

Para la familia *erm* se identificaron iniciadores de PCR para la amplificación de los alelos seleccionados. Los iniciadores identificados tienen una cobertura de 100%. Se diseñaron iniciadores de PCR con el objetivo de amplificar las variantes seleccionadas. El par de iniciadores de PCR contó con 100% de cobertura (Cuadro 20).

Cuadro 20. Iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de alelos *ermC* y *ermB*.

Familia	Objetivo de amplificación	Total alelos	No. iniciador	Cobertura (%)	Referencia
<i>erm</i>	<i>ermB</i> , <i>ermC</i>	2	1	100	Presente estudio
<i>erm</i>	Variante <i>ermB</i>	1	1	100	(Liu et al., 2020)
<i>erm</i>	Variante <i>ermB</i>	1	2	100	(Tolosi et al., 2021)
<i>erm</i>	Variante <i>ermB</i>	1	3	100	(Schmidt et al., 2015)
<i>erm</i>	Variante <i>ermB</i>	1	4	100	(Inuwa et al., 2022)
<i>erm</i>	Variante <i>ermC</i>	1	1	100	(Souza-Silva et al., 2022)
<i>erm</i>	Variante <i>ermC</i>	1	2	100	(Rasha et al., 2018)
<i>erm</i>	Variante <i>ermC</i>	1	3	100	(Mišić et al., 2017)
<i>erm</i>	Variante <i>ermC</i>	1	4	100	(Kishk et al., 2020)

V.8 Análisis familia *sul*

La familia de genes *sul* se compone de 4 variantes, de los cuales *sul1*, *sul2* y *sul3* son los más cercanos con un 66% de identidad, mientras que *sul4* es más distante con un 51% de identidad con respecto a los demás alelos (Venkatesan et al., 2023). Para el presente estudio se seleccionaron los alelos *sul1* y *sul2*, de mayor importancia en sistemas de producción animal.

V.8.1 Identificación, análisis y diseño de iniciadores de PCR

Los iniciadores de PCR identificados en la literatura para los alelos seleccionados tuvieron una cobertura del 100%. En el presente trabajo se se desarrollaron iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de los alelos *sul1*, *sul2* y *sul3*. Los iniciadores diseñados tienen una cobertura del 75% (Cuadro 21).

Cuadro 21. Iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de alelos de la familia *sul*.

Familia	Objetivo de amplificación	Total alelos	No. iniciador	Cobertura (%)	Referencia
<i>sul</i>	Familia <i>sul</i>	4	1	75	Presente estudio
<i>sul</i>	Variante <i>sul1</i>	1	1	100	(Cacace et al., 2019)
<i>sul</i>	Variante <i>sul1</i>	1	2	100	(Liu et al., 2020)
<i>sul</i>	Variante <i>sul1</i>	1	3	100	(Turcotte et al., 2020)
<i>sul</i>	Variante <i>sul1</i>	1	4	100	(Inuwa et al., 2022)
<i>sul</i>	Variante <i>sul2</i>	1	1	100	(Zhu et al., 2021b)
<i>sul</i>	Variante <i>sul2</i>	1	2	100	(Liu et al., 2020)
<i>Sul</i>	Variante <i>sul2</i>	1	3	100	(Inuwa et al., 2022)
<i>sul</i>	Variante <i>sul2</i>	1	4	100	(Schmidt et al., 2015)

V.9 Estandarización de ensayos de qPCR para detección de DGRA.

V.9.1 Estandarización de temperaturas de alineación de iniciadores de qPCR diseñados en el presente estudio empleando ADN de aislamientos.

Con el objetivo de identificar las mejores condiciones de amplificación se diseñaron gradientes de temperaturas de alineación en correspondencia de las características de cada par de iniciador de qPCR (Cuadro 5 Apartado Metodología). Se empleó ADN del cepario del Laboratorio de Microbiología Molecular previamente secuenciadas por lo que se conocía que contenían los genes de interés. Se seleccionaron las temperaturas donde se obtuvo mejor visualización del producto amplificado (Cuadro 22).

Cuadro 22. Temperaturas de alineación seleccionadas los iniciadores de qPCR *qnr*, *blaTEM*, *blaCTX-M* y *blaCMY*.

Iniciador de PCR	Objetivo de amplificación	Temp. de alineación
<i>qnr</i>	Subfamilias <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i>	60 °C
<i>blaTEM</i>	Subfamilia <i>blaTEM</i>	60 °C
<i>blaCTX-M</i>	Subfamilia <i>blaCTX-M</i>	60 °C
<i>blaCMY</i>	Subfamilia <i>blaCMY</i>	60 °C

Los iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de las familias de DGRA *sul*, *blaSHV* y *aadA* arrojaron inespecificidades en todas las temperaturas probadas en el ensayo; de igual forma sucedió con el iniciador de PCR dirigido a la amplificación de genes de resistencia a tetraciclinas asociados con el mecanismo de bombas eflujo (*tetA*), estas inespecificidades se deben a uniones de los iniciadores de PCR con fragmentos de ADN que no son nuestro objetivo de amplificación (uniones no específicas) pero comparten la secuencia del cebador o formación de dímeros de los iniciadores de PCR (Figura 12). Por esta razón, se procedió a estandarizar y

validar iniciadores de PCR de la literatura dirigidos a la amplificación de *sul1*, *sul2*, *blaSHV*, *aadA*, *tetQ*, *tetM*, *tetW*, *tetO*.

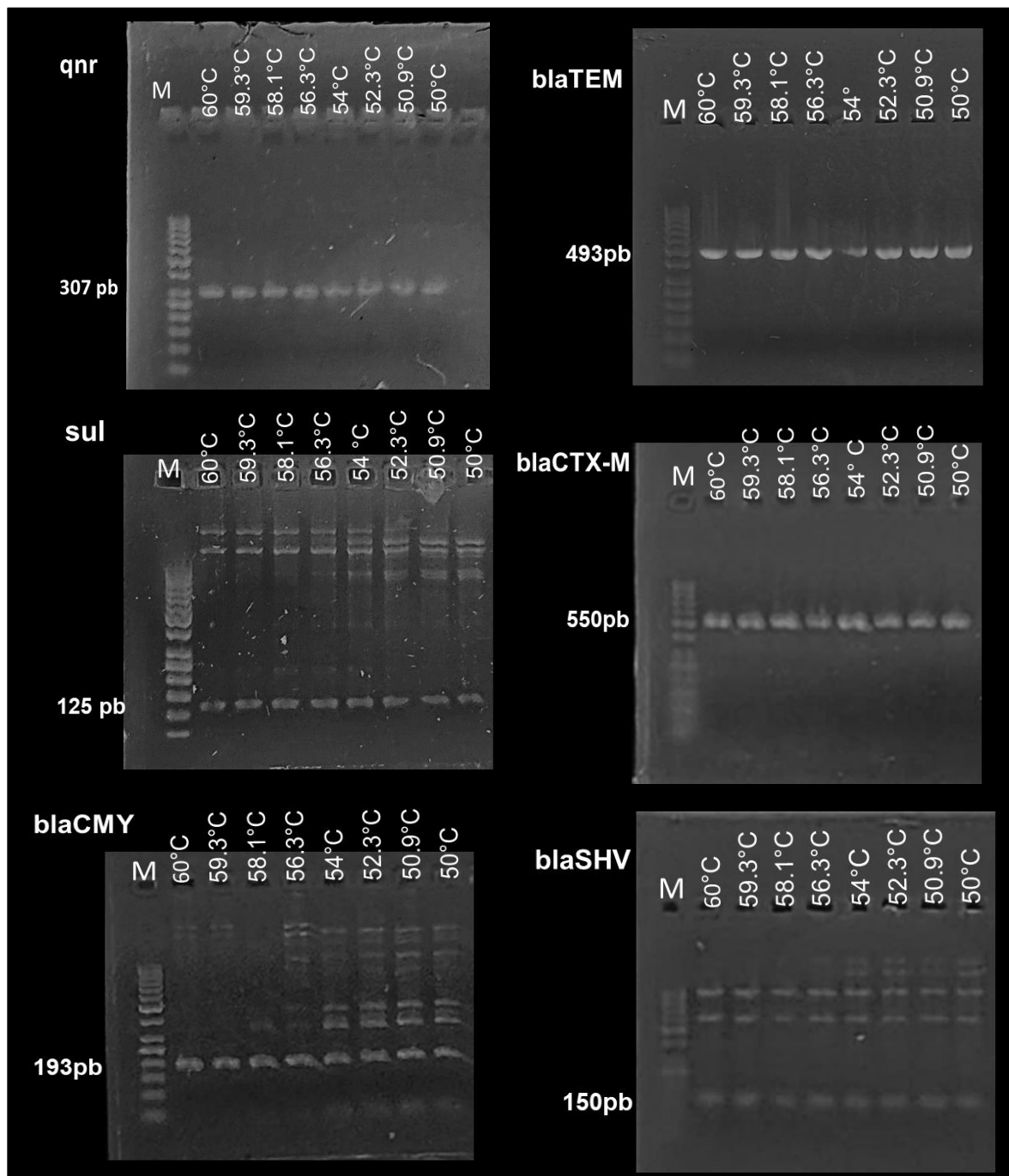
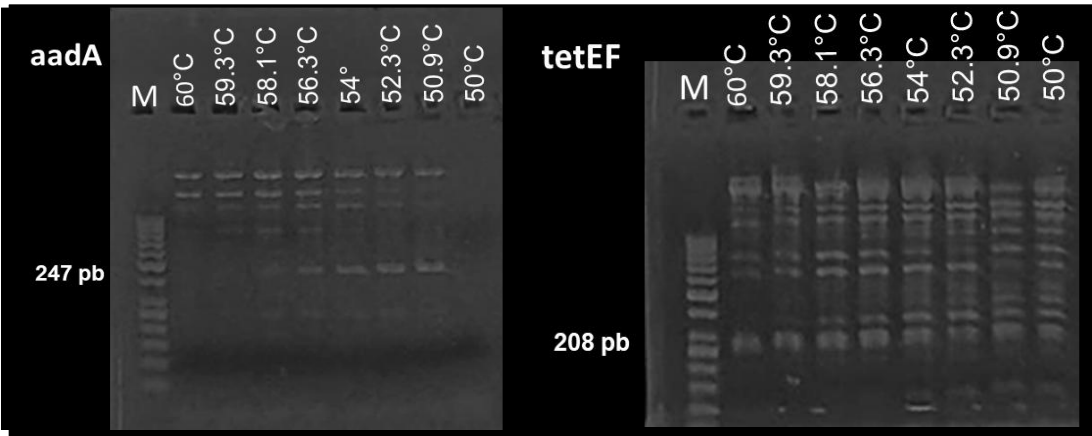


Figura 12. Gradientes de temperatura para estandarización de iniciadores de qPCR diseñados en el presente estudio con ADN de aislamientos. M: marcador de peso molecular 50pb.



Continuación Figura 12. Gradientes de temperatura para estandarización de iniciadores de qPCR diseñados en el presente estudio con ADN de aislamientos. M: marcador de peso molecular 50pb.

V.9.2. Estandarización de temperaturas de alineación de iniciadores de qPCR diseñados en el presente estudio empleando ADN ambiental.

Para la estandarización de las temperaturas de alineación de los iniciadores de PCR *erm* y *tetPR* dirigidos a la amplificación de los genes *ermB-ermC* y *tetO-tetM-tetW-tetQ* respectivamente, se realizaron 3 pools de ADN ambiental (cada pool compuesto por 5 ADN) de excretas de pollo perteneciente al banco de muestras del Laboratorio de Microbiología Molecular (Figura 13). Se seleccionaron las temperaturas donde se obtuvo mejor visualización del producto amplificado (Cuadro 23).

Cuadro 23. Temperaturas de alineación seleccionadas para los iniciadores de qPCR tetPR y erm.

Iniciador de PCR	Objetivo de amplificación	Temp. de alineación
tetPR	Alelos <i>tetQ</i> , <i>tetM</i> , <i>tetW</i> , <i>tetO</i>	60 °C
erm	Alelos <i>ermB</i> , <i>ermC</i>	54 °C

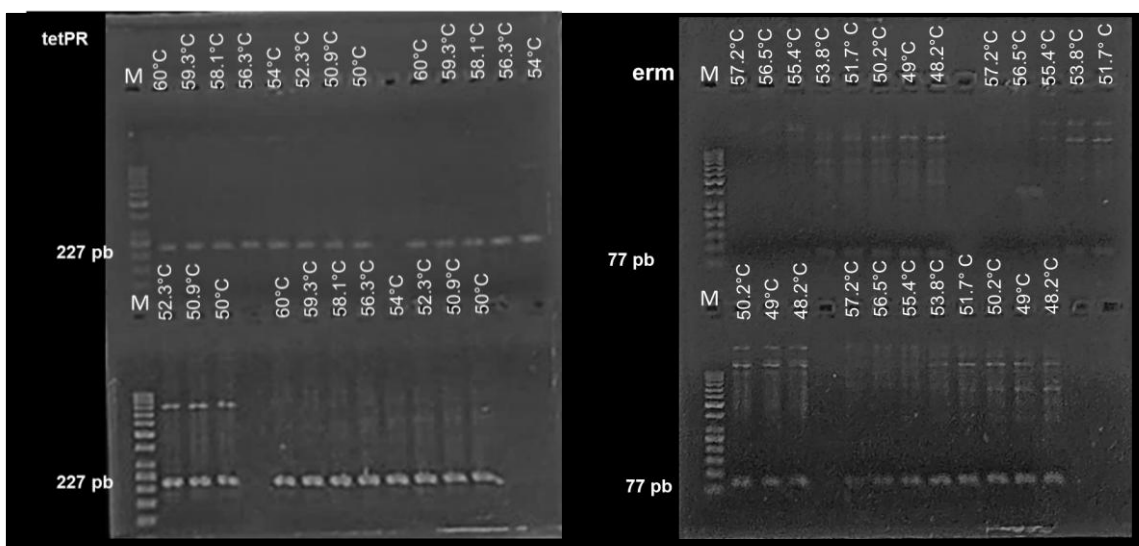


Figura 13. Gradientes de temperatura para estandarización de iniciadores de qPCR diseñados en el presente estudio con ADN ambiental. M: marcador de peso molecular 50pb.

V.9.3. Estandarización de temperaturas de alineación de iniciadores de qPCR reportados en la literatura.

Debido a la inespecificidad observada en los iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de los genes *blaSHV*, *aadA*, *sul* y *tetA* (*tetEF*) se seleccionaron de la base de datos de iniciadores de PCR previamente elaborada los de mayor cobertura y se les realizó gradientes de temperaturas con la finalidad de obtener las mejores condiciones de amplificación (Figura 14). En el caso de la familia de DGRA *sul*, se realizaron los gradientes para iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de los alelos *sul1* y *sul2*, genes anteriormente seleccionados en el estudio (Objetivo 1). Se

seleccionaron las temperaturas donde se obtuvo mejor visualización del producto amplificado (Cuadro 24).

Cuadro 24. Temperaturas de alineación seleccionadas para los iniciadores de qPCR *aadA-L*, *blaSHV-L*, *sul1* y *sul2*.

Iniciador de PCR	Objetivo de amplificación	Temp. de alineación
<i>aadA-L</i>	Familia <i>aadA</i>	60 °C
<i>blaSHV</i>	Subfamilia <i>blaSHV</i>	60 °C
<i>sul1</i>	Alelo <i>sul1</i>	60 °C
<i>sul2</i>	Alelo <i>sul2</i>	55 °C

Con el objetivo de implementar en la herramienta epidemiológica la detección de elementos genéticos móviles indicativos de contaminación antropogénica, se añadió la detección del gen codificante para integrón de clase 1 o *int1*. Se realizaron gradientes de temperaturas de iniciadores de PCR reportados en la literatura que tuviera como objetivo de amplificación *int1*. Los ensayos se realizaron con ADN de aislamientos bacterianos previamente secuenciados que se conocía albergaban plásmidos (cada pool estaba compuesto de 5 ADN). Se seleccionó como temperatura de alineación 60°C (Figura 15).

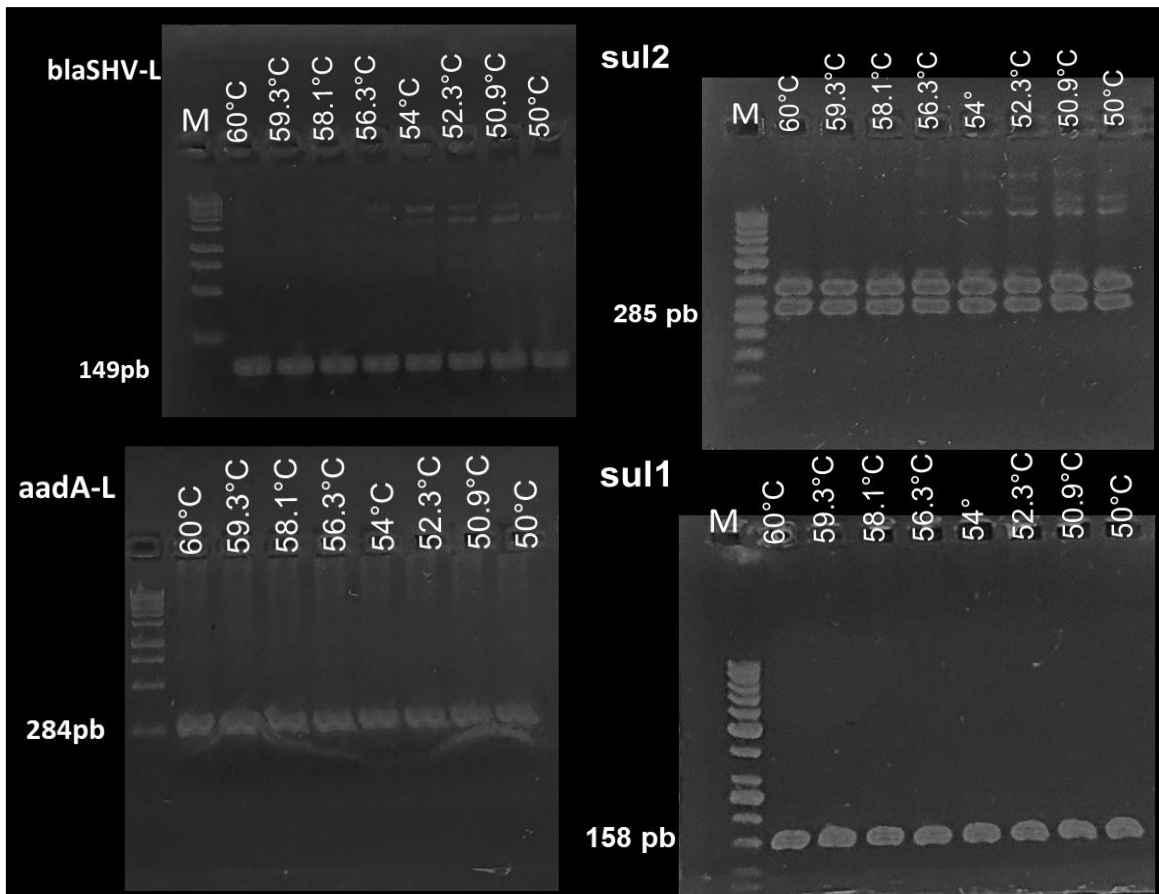


Figura 14. Gradientes de temperatura para estandarización de iniciadores de qPCR reportados en la literatura. M: marcador de peso molecular 1kb aadA-L y blaSHV-L. M: marcador de peso molecular 50pb sul1 y sul2

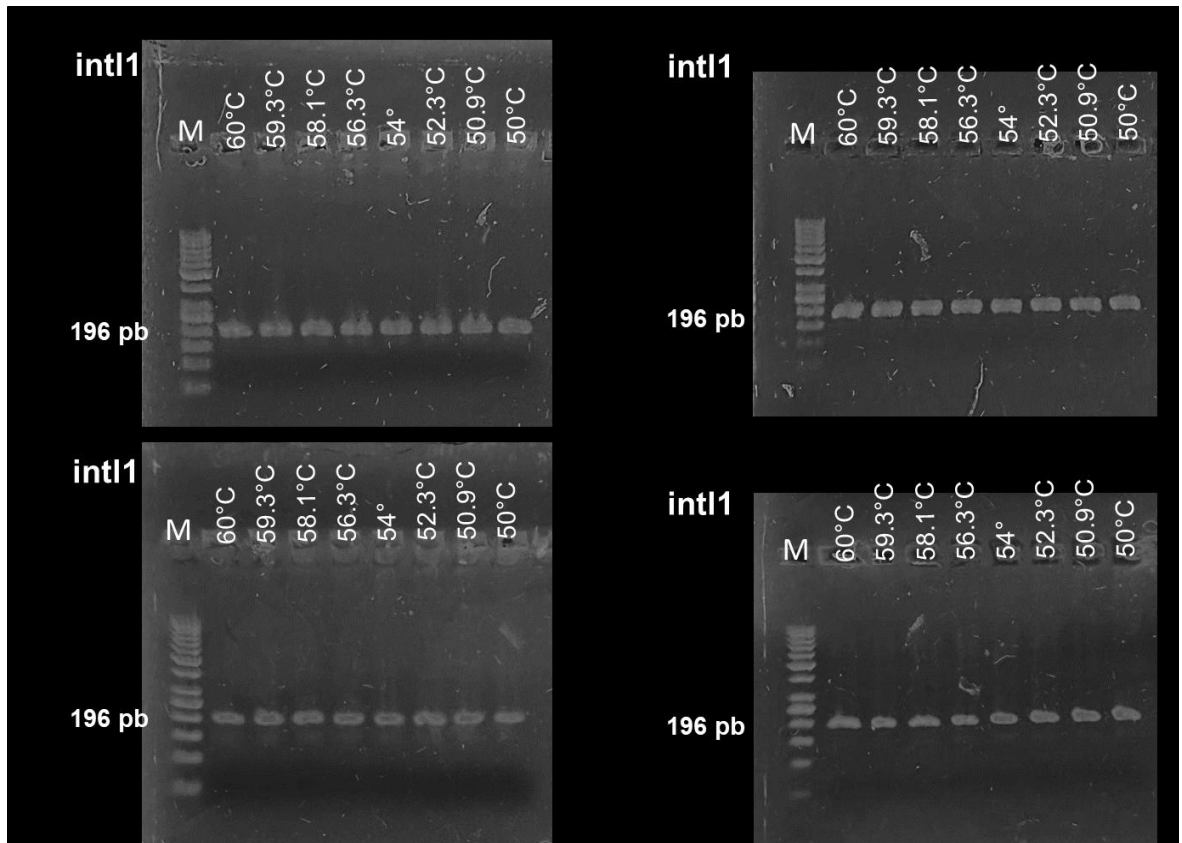


Figura 15. Gradientes de temperatura para estandarización de iniciadores de qPCR para amplificación de gen *int11*. M: marcador de peso molecular 50pb

V.9.4. Estandarización de iniciadores de qPCR para amplificación de gen *16SrRNA*.

Para determinar abundancia relativa se utilizará el gen *16SrRNA* como gen constitutivo; por esta razón, con la utilización de la base de datos SILVA, se analizaron 5 iniciadores de qPCR previamente reportados en la literatura. Se analizaron los datos de cobertura de los iniciadores de PCR en cuanto a dominio *Bacteria*, filo *Bacillota* y división *Proteobacteria* (Figura 16). Se analizaron específicamente este dominio, filo y división ya que las bacterias patógenas prevalentes en sistemas de producción animal pertenecen a los mismos las bacterias más prevalentes en entornos de producción animal (Abd El-Baky et al., 2020; Liu et al., 2020; Mustedanagic et al., 2023; Teng et al., 2022). Fueron

seleccionados para el estudio los iniciadores 1 y 3 ya que presentaban los valores más altos de cobertura.

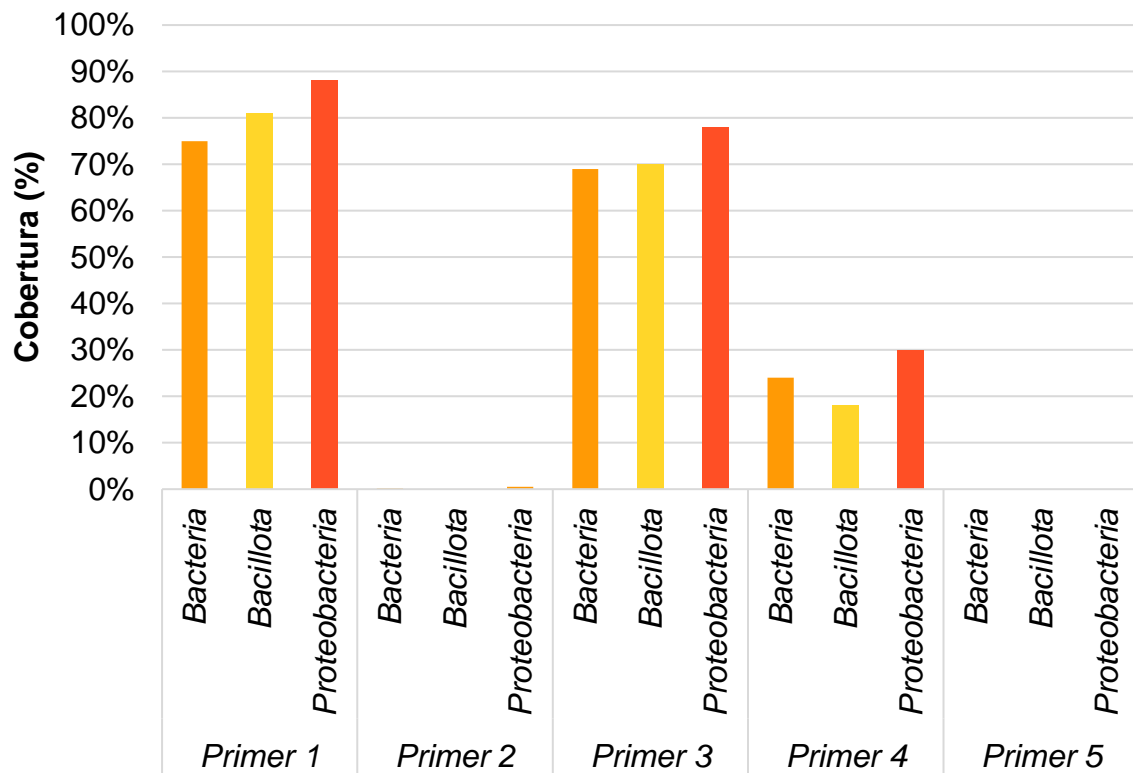


Figura 16. Cobertura iniciadores de qPCR dirigidos a la amplificación del gen *16SrRNA* reportados en la literatura.

Posteriormente realizaron gradientes de temperatura para obtener la temperatura óptima de alineación de los iniciadores (Figura 17). Se seleccionó para el estudio el iniciador de qPCR número 1, puesto que el número 3 es inespecífico.

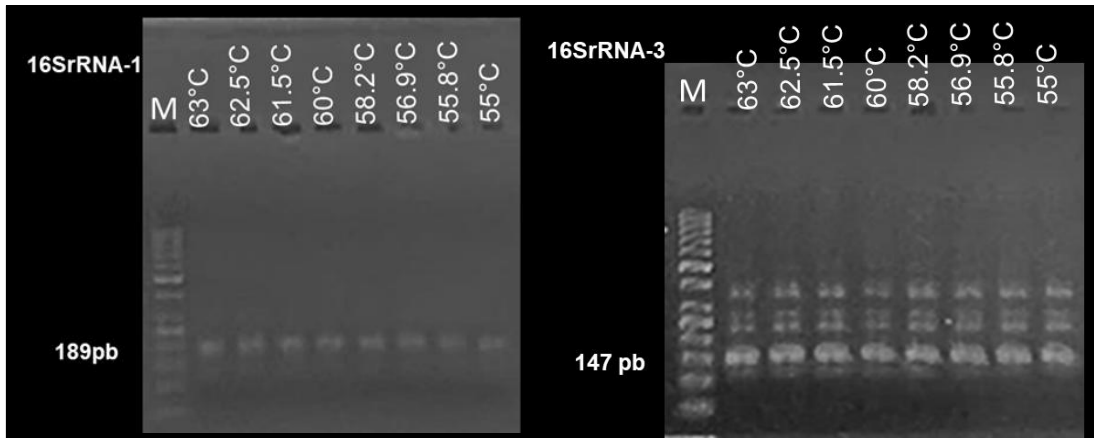


Figura 17. Gradientes de temperatura de alineación de iniciadores de qPCR dirigidos a la amplificación del gen *16SrRNA* reportados en la literatura. M: marcador de peso molecular 50pb.

V.10 Estandarización y validación de ensayos de qPCR para detección de DGRA.

Se realizaron curvas estándar empleando diluciones quintuples seriadas (1:5) para la validación de cada iniciador de qPCR. La reacción se llevó a cabo utilizando el protocolo de qPCR previamente descrito en el apartado de Metodología y posteriormente con el empleo del software CFX Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) se analizaron las curvas estándar de amplificación y las curvas de disociación generadas en cada reacción. Se obtuvieron datos de Eficiencia del ensayo mayores al 95% en cada uno de los casos (Cuadro 25). En el caso del iniciador de PCR *qnr* dirigido a la amplificación de las subfamilias *qnrB* y *qnrS*, e iniciadores de PCR *erm* dirigidos a la amplificación de los alelos *ermB* y *ermC* no se obtuvieron amplificaciones en la qPCR, por lo que se pasó a estandarizar iniciadores de qPCR previamente repostados y validados en la literatura.

Cuadro 25. Parámetros obtenidos en las curvas de iniciadores de qPCR.

Iniciador de qPCR	Objetivo de amplificación	Eficiencia (%)	R ²	Slope	Temp. melting
blaSHV	Subfamilia <i>blaSHV</i>	99.8%	0.996	-3.326	91°C
blaTEM	Subfamilia <i>blaTEM</i>	98.7%	0.990	-3.353	85 °C
blaCMY	Subfamilia <i>blaCMY</i>	99.3%	0.993	-3.338	87.50 °C
qnrB	Subfamilia <i>qnrB</i>	98.2%	0.988	-3.365	81.50 °C
Int1	Gen <i>int1</i>	102.3%	0.990	-3.268	91 °C
16SrRNA-1	Gen <i>16SrRNA</i>	104.3%	0.982	-3.222	84.50 °C
sul1	Gen <i>sul1</i>	96%	0.990	-3.422	86 °C
sul2	Gen <i>sul2</i>	101.9%	0.993	-3.276	88.50 °C

V.11 Detección de DGRA de importancia en salud pública y veterinaria en muestras clínicas y ambientales.

Para la implementación de los ensayos previamente estandarizados de emplearon un total de 80 muestras: 20 muestras de heces de sistema de producción bovino, 20 muestras de heces de sistema de producción porcino de granja experimental, 20 muestras de heces de sistema de producción porcino de granja comercial y 20 muestras de suelo de sistema de producción avícola.

Con la utilización de los ensayos de qPCR en las muestras de suelo se observó una prevalencia de 100% de genes que confieren resistencia a fluoroquinolonas (*qnrB*), seguido de sulfamidas 97.5% (representada por los genes *sul1* y *sul2*) y betalactámicos (*blaSHV*, *blaCMY*, *blaTEM*) 96.7%. Estos resultados evidencian una vez más que el uso inadecuado de antibióticos en sistemas de producción animal favorecen la presencia de genes de DGRA en dichos entornos; antibióticos como

fluoroquinolonas, sulfamidas y betalactámicos son de los más empleados en producción animal (Magnusson, 2022). El análisis de abundancias relativas reveló que en *intl1* en estas muestras tuvo una mayor abundancia, seguido de *sul1*, *qnrB*, *blaCMY*, *sul2*, *blaSHV* y el menos abundante fue *blaTEM* (Figura 18A).

En muestras provenientes de sistemas de producción bovino comercial se observó una prevalencia de 100% en genes que confieren resistencia a fluoroquinolonas y sulfamidas (*qnrB* y *sul1*, *sul2* respectivamente), seguido de betalactámicos 90% (representado por genes *blaSHV*, *blaCMY*, *blaTEM*). Las abundancias relativas en estas muestras fueron mayores para el gen *intl1* seguido de genes que confieren resistencia a sulfamidas *sul1* y *sul2*, y menos abundantes *qnrB*, *blaSHV*, *blaTEM* y *blaCMY* en el orden mencionado (Figura 18B).

En muestras de sistemas de producción porcino comercial y experimental se obtuvo una prevalencia de 100% de genes que confieren resistencia a fluoroquinolonas (*qnrB*) y sulfamidas (*sul1* y *sul2*), seguidas de betalactámicos 93.3% y 86.7% (representado por genes *blaSHV*, *blaCMY*, *blaTEM*) respectivamente. Las abundancias relativas del gen *intl1* fueron más elevadas en ambos entornos; en sistema de producción porcino comercial genes de resistencia a fluoroquinolonas (*qnrB*) y sulfamidas (*sul1* y *sul2*) tuvieron abundancias relativas elevadas, seguido de genes de resistencia a betalactámicos *blaSHV*, *blaCMY*, *blaTEM* (Figura 18C), mientras que, en entorno experimental se observó mayor abundancia de *blaSHV*, seguida de *qnrB*, *sul1*, *blaCMY*, *sul2* y *blaTEM* (Figura 18D).

Estos resultados confirman la capacidad de los ensayos estandarizados previamente para la detección de las DGRA de interés, además, igual que en estudios anteriores nos indican la alta prevalencia de estos genes en sistemas de producción animal (Lührmann et al., 2023; Peng et al., 2022; Zheng et al., 2024).

Los análisis de abundancia relativa del *intl1* revelaron que este EMG fue más abundante en todos los entornos analizados (Figura 18). Resultados comparables fueron encontrados en estudios anteriores relacionados a sistemas de producción animal, donde el *intl1* fue principalmente detectado en muestras ambientales (Zhu

et al., 2021), indicando el papel fundamental que tiene este EMG en la propagación de resistencia a antibióticos (Baker et al., 2023).

Se detectó mayor abundancia relativa de *bla*CMY y *qnr*B que confieren resistencia a antibióticos betalactámicos y fluoroquinolonas en muestras de suelo, seguida de las muestras provenientes de sistema de producción porcino comercial (Figura 19A, B). La subfamilia *bla*SHV tuvo mayor abundancia relativa en muestras de suelo, seguido de las muestras de sistemas de producción porcino experimental (Figura 19C). En el caso de la familia *bla*TEM la mayor abundancia relativa fue encontrada en muestras provenientes de sistemas de producción porcino comercial seguido de sistema de producción bovino (Figura 19D). La familia *sul* fue analizada mediante la detección y cuantificación de 2 alelos *sul*1 y *sul*2, en ambos casos las muestras de suelo tuvieron una mayor abundancia relativa seguido por las muestras de sistemas de producción porcino comercial y sistemas de producción bovino respectivamente (Figura 19E, F). Cabe destacar que al identificar y cuantificar solamente DGRA sin identificar la bacteria portadora se desconoce si estos genes de resistencia forman parte de bacterias patógenas o comensales, sin embargo, aunque estos genes de resistencia no se encuentren albergados en bacterias patógenas su presencia en el entorno aumenta el riesgo de que mediante la THG específicamente procesos de transducción, transformación o conjugación puedan ser adquiridos por bacterias patógenas del ambiente o oportunistas (Guernier-Cambert et al., 2021). De esta manera la metodología planteada también pudiera emplearse como método preventivo y de caracterización. Los datos revelados en el presente trabajo fueron similares a los encontrados en estudios anteriores en sistemas de producción animal y muestras de suelo (Cao et al., 2020; Casaux et al., 2023; Kwon et al., 2021; Luo et al., 2023), estos resultados sugieren que se debe mantener una vigilancia constante con respecto a estas familias de DGRA que confieren resistencia a antibióticos de importancia crítica y elevada en humanos y animales como se ha mencionado a lo largo del trabajo.

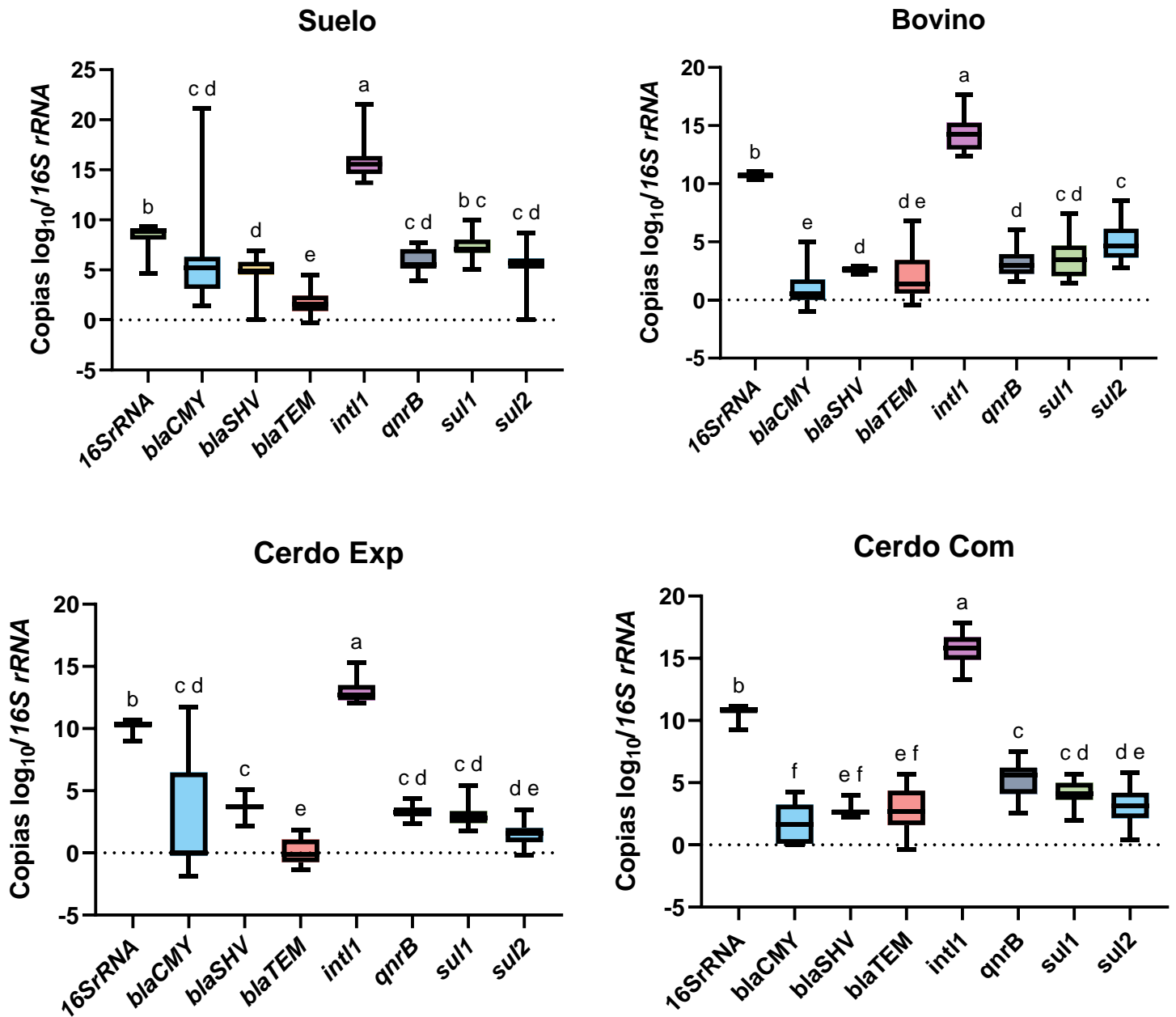


Figura 18. Abundancia relativa de DGRA de interés por tipo de muestra en número de copias expresados en log₁₀. A) Muestras de Suelo. B) Muestras sistema de producción bovino. C) Muestras sistema de producción porcino granja experimental. D) Sistema de producción porcino granja comercial.

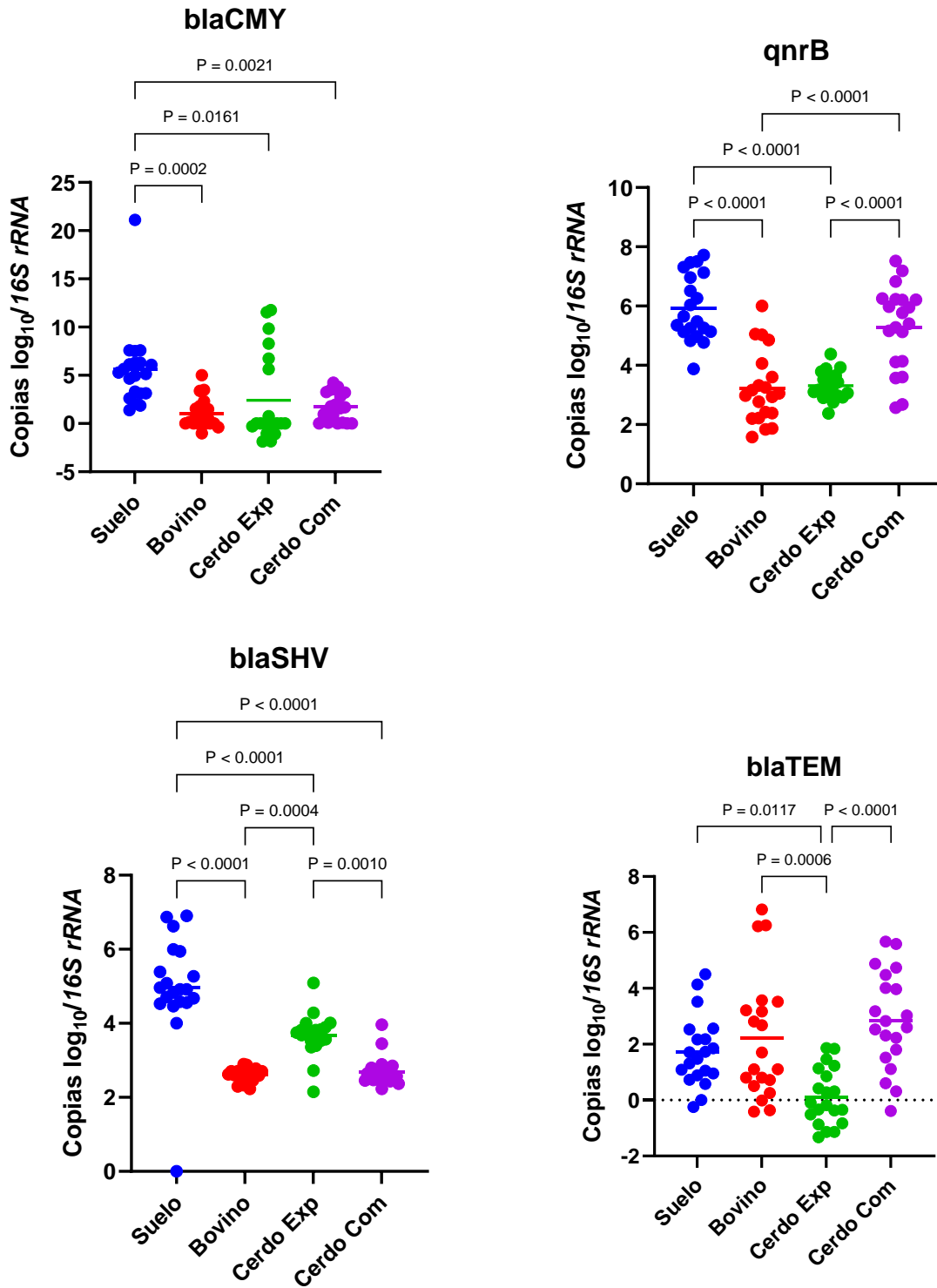
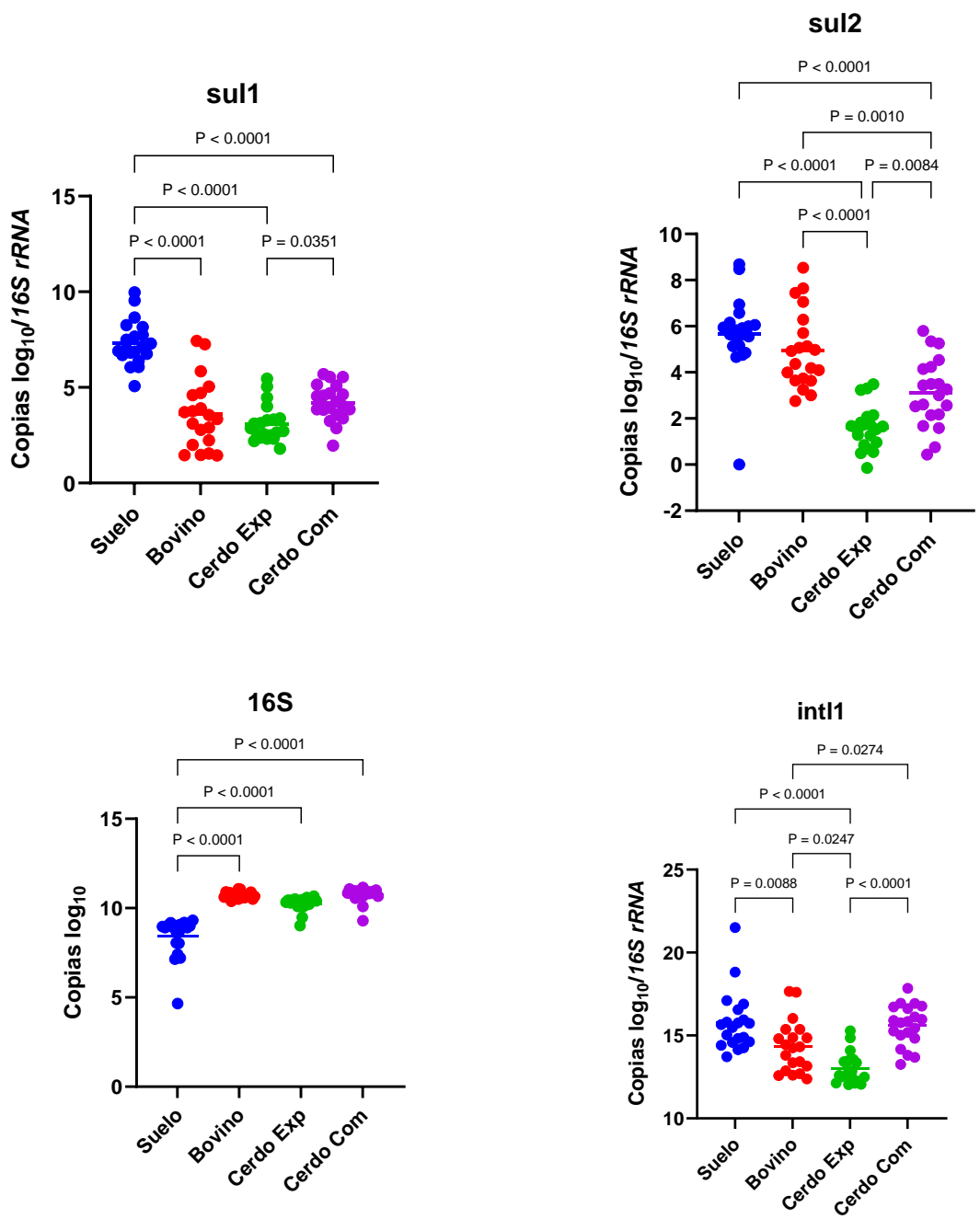


Figura 19. Abundancia relativa de DGRA de interés en número de copias expresados en \log_{10} . A) *blaCMY* B) *qnrB* C) *blaSHV* D) *blaTEM* C) *sul1* F) *sul2* G) *16SrRNA* H) *intI1*



Continuación Figura 19. Abundancia relativa de DGRA de interés en número de copias expresados en log₁₀. A) *bla*CMY B) *qnr*B C) *bla*SHV D) *bla*TEM E) *sul1* F) *sul2* G) 16SrRNA H) *int1*

VI LIMITANTES DEL ESTUDIO

La herramienta estandarizada en el presente estudio permitirá la identificación y cuantificación de genes de resistencia a antibióticos presentes en sistemas de producción animal en un periodo de 24 horas con un alto nivel de especificidad; sin embargo, a pesar de todas las virtudes de la PCR Tiempo Real, cabe destacar que la técnica posee algunas limitaciones como: i) necesidad de personal capacitado debido a que esto disminuiría los riesgos de contaminación en el proceso de extracción de ADN o preparación de la Mix para la reacción de PCR así como también se reducirían los inhibidores en la reacción y los falsos negativos; ii) mutaciones de genes conocidos, la qPCR solo podrá identificar y cuantificar los genes que ya se conocen y para los cuales previamente ya se hayan diseñado iniciadores de PCR, no permite identificar nuevos genes ni mutaciones; iii) costo de reactivos e insumos; iv) diseño de iniciadores de qPCR, es necesario el diseño de cebadores específicos que permitan solamente la amplificación del gen de interés y no formen dímeros entre sí, ya que esto pudiera generar falsos positivos; v) necesidad de contar con cepas que contengan los genes de interés para la realización de curvas estándar que permitirán la cuantificación; vi) no se podrá determinar si los genes de resistencia identificados y cuantificados provienen de una bacteria comensal, patógena o son extracelulares (eGRA) y iv) no se podrá determinar el grado de multiresistencia de las cepas que se analizarán.

Para fines del proyecto de investigación se continua con la estandarización y validación de iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de las demás DGRA identificadas en el estudio de importancia en salud pública y veterinaria.

VII CONCLUSIONES

En el presente trabajo se desarrolló una metodología para la detección de DGRA de importancia clínica. Esto permitió la validación y estandarización de ensayos de qPCR para la cuantificación de genes que confieren resistencia a antibióticos betalactámicos (*blaCTX-M*, *blaCMY*, *blaTEM*, *blaSHV*), sulfamidas (*sul1*, *sul2*) y quinolonas (*qnrB*). Esta metodología permitirá la generación de datos de prevalencia, diversidad y distribución de estos genes en diferentes entornos.

El presente estudio, además, permitió el establecimiento de un marco de referencia de DGRA más prevalentes en ambientes de producción animal; se pudo llegar a la conclusión de que más del 60% de las mismas confieren resistencia a antibióticos de importancia crítica para humanos y animales, registrándose una mayor resistencia a fluoroquinolonas (100%), seguida de sulfamidas (99%) y betalactámicos (92%). Estos marcadores se utilizan a nivel global para análisis epidemiológicos de resistencia a antibióticos por ejemplo Asia, Europa y América (Foudraine et al., 2021; Salerno et al., 2022; Sharif et al., 2023; Zalewska et al., 2021).

Los resultados del presente trabajo serán fundamentales para establecer una vigilancia epidemiológica que permita monitorear la prevalencia, abundancia y distribución de genes de resistencia en entornos de producción animal que pudieran afectar posteriormente a la salud humana. Esto permitirá establecer estrategias para reducir la presencia de DGRA en entornos de producción y a su vez disminuir la propagación de BRA entre humanos-animales y ambiente; teniendo como resultado mayor control de BRA lo cual va llevar a la recuperación de la eficacia de los tratamientos antimicrobianos en salud pública y veterinaria.

VIII REFERENCIAS

- Abd El-Baky, R. M., Ibrahim, R. A., Mohamed, D. S., Ahmed, E. F., & Hashem, Z. S. (2020). Prevalence of Virulence Genes and Their Association with Antimicrobial Resistance Among Pathogenic *E. coli* Isolated from Egyptian Patients with Different Clinical Infections. *Infection and Drug Resistance*, *Volume 13*, 1221–1236. <https://doi.org/10.2147/IDR.S241073>
- Adi Wicaksono, W., Braun, M., Bernhardt, J., Riedel, K., Cernava, T., & Berg, G. (2022). Trade-off for survival: Microbiome response to chemical exposure combines activation of intrinsic resistances and adapted metabolic activity. *Environment International*, *168*, 107474. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107474>
- Adzitey, F., Huda, N., & Ali, G. R. R. (2013). Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks. *3 Biotech*, *3*(2), 97–107. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0074-4>
- Alcock, B. P., Huynh, W., Chalil, R., Smith, K. W., Raphenya, A. R., Wlodarski, M. A., Edalatmand, A., Petkau, A., Syed, S. A., Tsang, K. K., Baker, S. J. C., Dave, M., McCarthy, M. C., Mukiri, K. M., Nasir, J. A., Golbon, B., Imtiaz, H., Jiang, X., Kaur, K., ... McArthur, A. G. (2023). CARD 2023: Expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Research*, *51*(D1), D690–D699. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac920>
- Allel, K., Day, L., Hamilton, A., Lin, L., Furuya-Kanamori, L., Moore, C. E., Van Boeckel, T., Laxminarayan, R., & Yakob, L. (2023). Global antimicrobial-resistance drivers: An ecological country-level study at the human–animal interface. *The Lancet Planetary Health*, *7*(4), e291–e303. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(23\)00026-8](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(23)00026-8)
- Asgin, N., Otlu, B., Cakmakliogullari, E. K., & Celik, B. (2019). High prevalence of TEM, VIM, and OXA-2 beta-lactamases and clonal diversity among *Acinetobacter baumannii* isolates in Turkey. *The Journal of Infection in Developing Countries*, *13*(09), 794–801. <https://doi.org/10.3855/jidc.11684>
- Atassi, G., Medernach, R., Scheetz, M., Nozick, S., Rhodes, N. J., Murphy-Belcaster, M., Murphy, K. R., Alisoltani, A., Ozer, E. A., & Hauser, A. R. (2023). Genomics of Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infections at a United States Academic Hospital. *Microbiology Spectrum*, *11*(3), e05087-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.05087-22>
- Baker, M., Zhang, X., Maciel-Guerra, A., Dong, Y., Wang, W., Hu, Y., Renney, D., Hu, Y., Liu, L., Li, H., Tong, Z., Zhang, M., Geng, Y., Zhao, L., Hao, Z., Senin, N., Chen, J., Peng, Z., Li, F., & Dottorini, T. (2023). Machine learning and metagenomics reveal shared antimicrobial resistance profiles across multiple chicken farms and abattoirs in China. *Nature Food*, *4*(8), 707–720. <https://doi.org/10.1038/s43016-023-00814-w>
- Barton Behravesh, C. (2019). Introduction. One Health: Over a decade of progress on the road to sustainability: -EN- -FR- Introduction. Une seule santé : plus d'une décennie d'avancées vers la durabilité -ES- Introducción. Una sola

- salud: más de un decenio de avances en la senda de la sostenibilidad. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 38(1), 21–50. <https://doi.org/10.20506/rst.38.1.2939>
- Bell, J. A., Weckstein, J. D., Fecchio, A., & Tkach, V. V. (2015). A new real-time PCR protocol for detection of avian haemosporidians. *Parasites & Vectors*, 8(1), 383. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0993-0>
- Best, A., & Abu Kwaik, Y. (2019). Nutrition and Bipartite Metabolism of Intracellular Pathogens. *Trends in Microbiology*, 27(6), 550–561. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.12.012>
- Birkegård, A. C., Halasa, T., Græsbøll, K., Clasen, J., Folkesson, A., & Toft, N. (2017). Association between selected antimicrobial resistance genes and antimicrobial exposure in Danish pig farms. *Scientific Reports*, 7(1), 9683. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10092-9>
- Böckelmann, U., Dörries, H.-H., Ayuso-Gabella, M. N., Salgot de Marçay, M., Tandoi, V., Levantesi, C., Masciopinto, C., Van Houtte, E., Szewzyk, U., Wintgens, T., & Grohmann, E. (2009). Quantitative PCR Monitoring of Antibiotic Resistance Genes and Bacterial Pathogens in Three European Artificial Groundwater Recharge Systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(1), 154–163. <https://doi.org/10.1128/AEM.01649-08>
- Boin, A., Ekengren, M., & Rhinard, M. (Eds.). (2021). *Understanding the Creeping Crisis*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-70692-0>
- Borowiak, M., Baumann, B., Fischer, J., Thomas, K., Deneke, C., Hammerl, J. A., Szabo, I., & Malorny, B. (2020). Development of a Novel mcr-6 to mcr-9 Multiplex PCR and Assessment of mcr-1 to mcr-9 Occurrence in Colistin-Resistant *Salmonella enterica* Isolates From Environment, Feed, Animals and Food (2011–2018) in Germany. *Frontiers in Microbiology*, 11, 80. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00080>
- Braga, P. A. C., Tata, A., Gonçalves dos Santos, V., Barreiro, J. R., Schwab, N. V., Veiga dos Santos, M., Eberlin, M. N., & Ferreira, C. R. (2013). Bacterial identification: From the agar plate to the mass spectrometer. *RSC Adv.*, 3(4), 994–1008. <https://doi.org/10.1039/C2RA22063F>
- Brinkac, L., Voorhies, A., Gomez, A., & Nelson, K. E. (2017). The Threat of Antimicrobial Resistance on the Human Microbiome. *Microbial Ecology*, 74(4), 1001–1008. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0985-z>
- Bush, K., Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. (1995). *A Functional Classification Scheme for β -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure*. 39.
- Cacace, D., Fatta-Kassinos, D., Manaia, C. M., Cytryn, E., Kreuzinger, N., Rizzo, L., Karaolia, P., Schwartz, T., Alexander, J., Merlin, C., Garelick, H., Schmitt, H., de Vries, D., Schwermer, C. U., Méric, S., Ozkal, C. B., Pons, M.-N., Kneis, D., & Berendonk, T. U. (2019). Antibiotic resistance genes in treated wastewater and in the receiving water bodies: A pan-European survey of urban settings. *Water Research*, 162, 320–330. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.06.039>
- Cao, Z. Z., Xu, J. W., Gao, M., Li, X. S., Zhai, Y. J., Yu, K., Wan, M., & Luan, X. H. (2020). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates from

- goose farms in Northeast China. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 21(4), 287–293.
- Casaux, M. L., D'Alessandro, B., Vignoli, R., & Fraga, M. (2023). Phenotypic and genotypic survey of antibiotic resistance in *Salmonella enterica* isolates from dairy farms in Uruguay. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1055432. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1055432>
- Cauwerts, K., Decostere, A., De Graef, E. M., Haesebrouck, F., & Pasmans, F. (2007). High prevalence of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from broilers carrying the *erm* (B) gene. *Avian Pathology*, 36(5), 395–399. <https://doi.org/10.1080/03079450701589167>
- Chahorm, K., & Prakitchaiwattana, C. (2018). Application of Reverse Transcriptase-PCR-DGGE as a rapid method for routine determination of *Vibrio* spp. In foods. *International Journal of Food Microbiology*, 264, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.014>
- Chandler, M., Fayet, O., Rousseau, P., Ton Hoang, B., & Duval-Valentin, G. (2015). Copy-out–Paste-in Transposition of IS 911: A Major Transposition Pathway. *Microbiology Spectrum*, 3(4), 3.4.01. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0031-2014>
- Chen, J., Yu, Z., Michel, F. C., Wittum, T., & Morrison, M. (2007). Development and Application of Real-Time PCR Assays for Quantification of *erm* Genes Conferring Resistance to Macrolides-Lincosamides-Streptogramin B in Livestock Manure and Manure Management Systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 4407–4416. <https://doi.org/10.1128/AEM.02799-06>
- Deccache, Y., Ireng, L. M., Ambroise, J., Savov, E., Marinescu, D., Chirimwami, R. B., & Gala, J.-L. (2015). A qPCR and multiplex pyrosequencing assay combined with automated data processing for rapid and unambiguous detection of ESBL-producers Enterobacteriaceae. *AMB Express*, 5(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0136-1>
- Forootan, A., Sjöback, R., Björkman, J., Sjögreen, B., Linz, L., & Kubista, M. (2017). Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomolecular Detection and Quantification*, 12, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.04.001>
- Foudraine, D. E., Strepis, N., Stingl, C., Ten Kate, M. T., Verbon, A., Klaassen, C. H. W., Goessens, W. H. F., Luider, T. M., & Dekker, L. J. M. (2021). Exploring antimicrobial resistance to beta-lactams, aminoglycosides and fluoroquinolones in *E. coli* and *K. pneumoniae* using proteogenomics. *Scientific Reports*, 11(1), 12472. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91905-w>
- Frasao, B. da S., Marin, V. A., & Conte-Junior, C. A. (2017). Molecular Detection, Typing, and Quantification of *Campylobacter* spp. in Foods of Animal Origin: *Campylobacter* molecular tools in food.... *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(4), 721–734. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12274>
- Gebeyehu, D. T. (2021). Antibiotic Resistance Development in Animal Production: A Cross-Sectional Study. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, Volume 12, 101–108. <https://doi.org/10.2147/VMRR.S310169>

- Gheyas, A. A., & Burt, D. W. (2013). Microarray resources for genetic and genomic studies in chicken: A review. *Genesis*, 51(5), 337–356. <https://doi.org/10.1002/dvg.22387>
- Gillings, M. R. (2014). Integrons: Past, Present, and Future. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(2), 257–277. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00056-13>
- Gillings, M. R., Gaze, W. H., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, J. M., & Zhu, Y.-G. (2015). Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *The ISME Journal*, 9(6), 1269–1279. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.226>
- Gu, Y., Shen, S., Han, B., Tian, X., Yang, F., & Zhang, K. (2020). Family livestock waste: An ignored pollutant resource of antibiotic resistance genes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 197, 110567. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110567>
- Guernier-Cambert, V., Trachsel, J., Maki, J., Qi, J., Sylte, M. J., Hanafy, Z., Kathariou, S., & Looft, T. (2021). Natural Horizontal Gene Transfer of Antimicrobial Resistance Genes in *Campylobacter* spp. From Turkeys and Swine. *Frontiers in Microbiology*, 12, 732969. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.732969>
- Gutiérrez, D. R. T. (s/f). *Mtro. Alonso Lujambio Irazábal Secretario de Educación Pública*.
- Gutkind, G. O., Conza, J. D., Power, P., & Radice, M. (s/f). *-lactamase-mediated Resistance: A Biochemical, Epidemiological and Genetic Overview*.
- Hanson, N. D., Thomson, K. S., Moland, E. S., Sanders, C. C., Berthold, G., & Penn, R. G. (1999). Molecular characterization of a multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* encoding ESBLs and a plasmid-mediated AmpC. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 44(3), 377–380. <https://doi.org/10.1093/jac/44.3.377>
- He, Y., Yuan, Q., Mathieu, J., Stadler, L., Senehi, N., Sun, R., & Alvarez, P. J. J. (2020). *Antibiotic resistance genes from livestock waste: Occurrence, dissemination, and treatment*.
- Hernández-Mendoza, A., Salgado-Morales, R., Morán-Vázquez, A., López-Torres, D., García-Gómez, B. I., & Dantán-González, E. (2022). Molecular Characterization of pBOq-IncQ and pBOq-95LK Plasmids of *Escherichia coli* BOq 01, a New Isolated Strain from Poultry Farming, Involved in Antibiotic Resistance. *Microorganisms*, 10(8), 1509. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081509>
- Horie, M., Yang, D., Joosten, P., Munk, P., Wadepohl, K., Chauvin, C., Moyano, G., Skarżyńska, M., Dewulf, J., Aarestrup, F. M., Blaha, T., Sanders, P., Gonzalez-Zorn, B., Wasyl, D., Wagenaar, J. A., Heederik, D., Mevius, D., Schmitt, H., Smit, L. A. M., & Van Gompel, L. (2021). Risk Factors for Antimicrobial Resistance in Turkey Farms: A Cross-Sectional Study in Three European Countries. *Antibiotics*, 10(7), 820. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10070820>
- Huber, L., Agunos, A., Gow, S. P., Carson, C. A., & Van Boeckel, T. P. (2021). Reduction in Antimicrobial Use and Resistance to *Salmonella*, *Campylobacter*, and *Escherichia coli* in Broiler Chickens, Canada, 2013–

2019. *Emerging Infectious Diseases*, 27(9), 2434–2444. <https://doi.org/10.3201/eid2709.204395>
- Inuwa, A. B., Mahmood, Q., Iqbal, J., Widemann, E., Shafiq, S., Irshad, M., Irshad, U., Iqbal, A., Hafeez, F., & Nazir, R. (2022). Removal of Antibiotic Resistance Genes, Class 1 Integrase Gene and Escherichia coli Indicator Gene in a Microalgae-Based Wastewater Treatment System. *Antibiotics*, 11(11), 1531. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111531>
- Jibril, A. H., Okeke, I. N., Dalsgaard, A., & Olsen, J. E. (2021). Association between antimicrobial usage and resistance in Salmonella from poultry farms in Nigeria. *BMC Veterinary Research*, 17(1), 234. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02938-2>
- Karkman, A., Do, T. T., Walsh, F., & Virta, M. P. J. (2018). Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water. *Trends in Microbiology*, 26(3), 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.09.005>
- Khan, U., Afsana, S., Kibtia, M., Hossain, M., Choudhury, N., & Ahsan, C. R. (2019). Presence of blaCTX-M antibiotic resistance gene in Lactobacillus spp. Isolated from Hirschsprung diseased infants with stoma. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 13(05), 426–433. <https://doi.org/10.3855/jidc.10968>
- Kim, D.-W., & Cha, C.-J. (2021). Antibiotic resistome from the One-Health perspective: Understanding and controlling antimicrobial resistance transmission. *Experimental & Molecular Medicine*, 53(3), 301–309. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00569-z>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kwon, B.-R., Wei, B., Cha, S.-Y., Shang, K., Zhang, J.-F., Jang, H.-K., & Kang, M. (2021). Characterization of Extended-Spectrum Cephalosporin (ESC) Resistance in Salmonella Isolated from Chicken and Identification of High Frequency Transfer of blaCMY-2 Gene Harboring Plasmid In Vitro and In Vivo. *Animals*, 11(6), 1778. <https://doi.org/10.3390/ani11061778>
- Laconi, A., Mughini-Gras, L., Tolosi, R., Grilli, G., Trocino, A., Carraro, L., Di Cesare, F., Cagnardi, P., & Piccirillo, A. (2021). Microbial community composition and antimicrobial resistance in agricultural soils fertilized with livestock manure from conventional farming in Northern Italy. *Science of The Total Environment*, 760, 143404. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143404>
- Laiglesia, A. L., Martínez, P. S., Lasheras, E. G., Gracia, E. L., Serrano, J. M., & Triola, J. T. (s/f). MIGUEL GARCÍA LAMIGUEIRO, DKV.
- Lee, H.-W., Yoon, S.-R., Kim, S.-J., Lee, H. M., Lee, J. Y., Lee, J.-H., Kim, S. H., & Ha, J.-H. (2017). Identification of microbial communities, with a focus on foodborne pathogens, during kimchi manufacturing process using culture-independent and -dependent analyses. *LWT - Food Science and Technology*, 81, 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.001>
- Levy, S. B., McMurry, L. M., Barbosa, T. M., Burdett, V., Courvalin, P., Hillen, W., Roberts, M. C., Rood, J. I., & Taylor, D. E. (1999). Nomenclature for New

- Tetracycline Resistance Determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(6), 1523–1524. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.6.1523>
- Li, P., Yin, R., Cheng, J., & Lin, J. (2023). Bacterial Biofilm Formation on Biomaterials and Approaches to Its Treatment and Prevention. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14), 11680. <https://doi.org/10.3390/ijms241411680>
- Liang, C., Zhang, X., Zhou, L., Meng, G., Zhong, L., & Peng, P. (2021). Trends and correlation between antibacterial consumption and carbapenem resistance in gram-negative bacteria in a tertiary hospital in China from 2012 to 2019. *BMC Infectious Diseases*, 21(1), 444. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06140-5>
- Liu, Y., Dyall-Smith, M., Marena, M., Hu, H.-W., Browning, G., & Billman-Jacobe, H. (2020). Antibiotic Resistance Genes in Antibiotic-Free Chicken Farms. *Antibiotics*, 9(3), 120. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9030120>
- Lührmann, A., Palmi, A., Hellmich, J., Belik, V., Zentek, J., & Vahjen, W. (2023). Antimicrobial resistance- and pathogen patterns in the fecal microbiota of sows and their offspring in German commercial pig farms. *PLOS ONE*, 18(8), e0290554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0290554>
- Lund, D., Coertze, R. D., Parras-Moltó, M., Berglund, F., Flach, C.-F., Johnning, A., Larsson, D. G. J., & Kristiansson, E. (2023). Extensive screening reveals previously undiscovered aminoglycoside resistance genes in human pathogens. *Communications Biology*, 6(1), 812. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05174-6>
- Luo, S., Liao, C., Peng, J., Tao, S., Zhang, T., Dai, Y., Ding, Y., & Ma, Y. (2023). Resistance and virulence gene analysis and molecular typing of *Escherichia coli* from duck farms in Zhanjiang, China. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1202013. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1202013>
- Macedo, G., Hernandez-Leal, L., van der Maas, P., Heederik, D., Mevius, D., & Schmitt, H. (2020). The impact of manure and soil texture on antimicrobial resistance gene levels in farmlands and adjacent ditches. *Science of The Total Environment*, 737, 139563. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139563>
- Macedo, G., van Veelen, H. P. J., Hernandez-Leal, L., van der Maas, P., Heederik, D., Mevius, D., Bossers, A., & Schmitt, H. (2021). Targeted metagenomics reveals inferior resilience of farm soil resistome compared to soil microbiome after manure application. *Science of The Total Environment*, 770, 145399. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145399>
- Magnusson, U. (2022). Antimicrobial use and resistance in food-producing animals—How can we protect the efficacy of antibiotics for reproductive diseases? *Reproduction in Domestic Animals*, 57(S4), 13–20. <https://doi.org/10.1111/rda.14170>
- Maillard, J.-Y., & Centeleghe, I. (2023). How biofilm changes our understanding of cleaning and disinfection. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 12(1), 95. <https://doi.org/10.1186/s13756-023-01290-4>
- Mak, P. H. W., Rehman, M. A., Kiarie, E. G., Topp, E., & Diarra, M. S. (2022). Production systems and important antimicrobial resistant-pathogenic bacteria in poultry: A review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 13(1), 148. <https://doi.org/10.1186/s40104-022-00786-0>
- Martín, Z. H. (s/f). *Métodos de análisis de datos: Apuntes*.

- Mazhar, S. H., Li, X., Rashid, A., Su, J., Xu, J., Brejnrod, A. D., Su, J.-Q., Wu, Y., Zhu, Y.-G., Zhou, S. G., Feng, R., & Rensing, C. (2021). Co-selection of antibiotic resistance genes, and mobile genetic elements in the presence of heavy metals in poultry farm environments. *Science of The Total Environment*, 755, 142702. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142702>
- McEwen, S. A., & Collignon, P. J. (2018). Antimicrobial Resistance: A One Health Perspective. *Microbiology Spectrum*, 6(2), 6.2.10. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017>
- Mishra, S. K., Baidya, S., Bhattarai, A., Shrestha, S., Homagain, S., Rayamajhee, B., Hui, A., & Willcox, M. (2024). Bacteriology of endotracheal tube biofilms and antibiotic resistance: A systematic review. *Journal of Hospital Infection*, 147, 146–157. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2024.03.004>
- Mulchandani, R., Wang, Y., Gilbert, M., & Van Boeckel, T. P. (2023). Global trends in antimicrobial use in food-producing animals: 2020 to 2030. *PLOS Global Public Health*, 3(2), e0001305. <https://doi.org/10.1371/journal.pgph.0001305>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2), 4.2.15. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Mustedanagic, A., Matt, M., Weyermair, K., Schrattenecker, A., Kubitzka, I., Firth, C. L., Loncaric, I., Wagner, M., & Stessl, B. (2023). Assessment of microbial quality in poultry drinking water on farms in Austria. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1254442. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1254442>
- Nakajima, O., Akiyama, H., & Teshima, R. (2009). Real-Time Polymerase Chain Reaction Method for Detecting Contamination of Beef by Material from Genetically Engineered Cattle. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32(8), 1313–1316. <https://doi.org/10.1248/bpb.32.1313>
- Nhung, N., Cuong, N., Thwaites, G., & Carrique-Mas, J. (2016). Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance in Animal Production in Southeast Asia: A Review. *Antibiotics*, 5(4), 37. <https://doi.org/10.3390/antibiotics5040037>
- Pakbaten Toupkanlou, S., Najar Peerayeh, S., & Pirhajati Mahabadi, R. (2015). Class A and D Extended-Spectrum β -Lactamases in Imipenem Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Burn Patients in Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(8). <https://doi.org/10.5812/jjm.18352v2>
- Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), e00088-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
- 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. *Nature Communications*, 13(1), 1116. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28750-6>
- Petrin, S., Patuzzi, I., Di Cesare, A., Tiengo, A., Sette, G., Biancotto, G., Corno, G., Drigo, M., Losasso, C., & Cibin, V. (2019). Evaluation and quantification of antimicrobial residues and antimicrobial resistance genes in two Italian swine farms. *Environmental Pollution*, 255, 113183. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113183>

- Pilla, G., McVicker, G., & Tang, C. M. (2017). Genetic plasticity of the *Shigella* virulence plasmid is mediated by intra- and inter-molecular events between insertion sequences. *PLOS Genetics*, *13*(9), e1007014. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007014>
- Pokhrel, D., Thames, H. T., Zhang, L., Dinh, T. T. N., Schilling, W., White, S. B., Ramachandran, R., & Theradiyil Sukumaran, A. (2022). Roles of Aerotolerance, Biofilm Formation, and Viable but Non-Culturable State in the Survival of *Campylobacter jejuni* in Poultry Processing Environments. *Microorganisms*, *10*(11), 2165. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112165>
- Pornsukarom, S., van Vliet, A. H. M., & Thakur, S. (2018). Whole genome sequencing analysis of multiple *Salmonella* serovars provides insights into phylogenetic relatedness, antimicrobial resistance, and virulence markers across humans, food animals and agriculture environmental sources. *BMC Genomics*, *19*(1), 801. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5137-4>
- Qian, X., Gu, J., Sun, W., Wang, X.-J., Su, J.-Q., & Stedfeld, R. (2018). Diversity, abundance, and persistence of antibiotic resistance genes in various types of animal manure following industrial composting. *Journal of Hazardous Materials*, *344*, 716–722. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.11.020>
- Rahman, Md. M., Alam Tumpa, Mst. A., Zehravi, M., Sarker, Md. T., Yamin, Md., Islam, Md. R., Harun-Or-Rashid, Md., Ahmed, M., Ramproshad, S., Mondal, B., Dey, A., Damiri, F., Berrada, M., Rahman, Md. H., & Cavalu, S. (2022). An Overview of Antimicrobial Stewardship Optimization: The Use of Antibiotics in Humans and Animals to Prevent Resistance. *Antibiotics*, *11*(5), 667. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11050667>
- Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, *13*(6), 151–171. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2010.08.003>
- Roberts, A. P., Chandler, M., Courvalin, P., Guédon, G., Mullany, P., Pembroke, T., Rood, J. I., Jeffery Smith, C., Summers, A. O., Tsuda, M., & Berg, D. E. (2008). Revised nomenclature for transposable genetic elements. *Plasmid*, *60*(3), 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2008.08.001>
- Roberts, M. C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L. B., Rood, J., & Seppala, H. (1999). Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *43*(12), 2823–2830. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.12.2823>
- Rodrigues, G. L., Panzenhagen, P., Ferrari, R. G., dos Santos, A., Paschoalin, V. M. F., & Conte-Junior, C. A. (2020). Frequency of Antimicrobial Resistance Genes in *Salmonella* From Brazil by in silico Whole-Genome Sequencing Analysis: An Overview of the Last Four Decades. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1864. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01864>
- Rodrigues, P. A., Ferrari, R. G., & Conte-Junior, C. A. (2018). Application of molecular tools to elucidate the microbiota of seafood. *Journal of Applied Microbiology*, *124*(6), 1347–1365. <https://doi.org/10.1111/jam.13701>
- Rohde, A., Hammerl, J. A., Boone, I., Jansen, W., Fohler, S., Klein, G., Dieckmann, R., & Al Dahouk, S. (2017). Overview of validated alternative methods for the

- detection of foodborne bacterial pathogens. *Trends in Food Science & Technology*, 62, 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.006>
- Ruckert, A., Harris, F., Aenishaenslin, C., Aguiar, R., Boudreau-LeBlanc, A., Pedro Carmo, L., Labonté, R., Lambraki, I., Parmley, E. J., & Wiktorowicz, M. E. (2024). One Health governance principles for AMR surveillance: A scoping review and conceptual framework. *Research Directions: One Health*, 2, e4. <https://doi.org/10.1017/one.2023.13>
- Salerno, B., Cornaggia, M., Sabatino, R., Di Cesare, A., Furlan, M., Barco, L., Orsini, M., Cordioli, B., Mantovani, C., Bano, L., & Losasso, C. (2022). Calves as Main Reservoir of Antibiotic Resistance Genes in Dairy Farms. *Frontiers in Public Health*, 10, 918658. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.918658>
- Samreen, Ahmad, I., Malak, H. A., & Abulreesh, H. H. (2021). Environmental antimicrobial resistance and its drivers: A potential threat to public health. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 27, 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.08.001>
- Schar, D., Klein, E. Y., Laxminarayan, R., Gilbert, M., & Van Boeckel, T. P. (2020). Global trends in antimicrobial use in aquaculture. *Scientific Reports*, 10(1), 21878. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78849-3>
- Sharif, N., Ahmed, S. N., Khandaker, S., Monifa, N. H., Abusharha, A., Vargas, D. L. R., Díez, I. D. L. T., Castilla, A. G. K., Talukder, A. A., Parvez, A. K., & Dey, S. K. (2023). Multidrug resistance pattern and molecular epidemiology of pathogens among children with diarrhea in Bangladesh, 2019–2021. *Scientific Reports*, 13(1), 13975. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41174-6>
- Shen, X., Yang, H., Yu, S., Yao, K., Wang, Y., Yuan, L., & Yang, Y. (2008). Macrolide-Resistance Mechanisms in *Streptococcus pneumoniae* Isolates from Chinese Children in Association with Genes of *tetM* and Integrase of Conjugative Transposons 1545. *Microbial Drug Resistance*, 14(2), 155–161. <https://doi.org/10.1089/mdr.2008.0773>
- Sinclair, J. R. (2019). Importance of a One Health approach in advancing global health security and the Sustainable Development Goals: -EN- -FR- Importance de l'approche Une seule santé pour améliorer la sécurité sanitaire mondiale et atteindre les objectifs de développement durable -ES- Importancia de la noción de Una sola salud para promover la seguridad sanitaria mundial y los Objetivos de Desarrollo Sostenible. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 38(1), 145–154. <https://doi.org/10.20506/rst.38.1.2949>
- Stern, A. L., Van Der Verren, S. E., Kanchugal P, S., Näsval, J., Gutiérrez-de-Terán, H., & Selmer, M. (2018). Structural mechanism of AadA, a dual-specificity aminoglycoside adenylyltransferase from *Salmonella enterica*. *Journal of Biological Chemistry*, 293(29), 11481–11490. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003989>
- Tang, K. L., Caffrey, N. P., Nóbrega, D. B., Cork, S. C., Ronksley, P. E., Barkema, H. W., Polachek, A. J., Ganshorn, H., Sharma, N., Kellner, J. D., & Ghali, W. A. (2017). Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Planetary Health*, 1(8), e316–e327. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(17\)30141-9](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(17)30141-9)

- Tate, H., Li, C., Nyirabahizi, E., Tyson, G. H., Zhao, S., Rice-Trujillo, C., Jones, S. B., Ayers, S., M'ikanatha, N. M., Hanna, S., Ruesch, L., Cavanaugh, M. E., Laksanalamai, P., Mingle, L., Matzinger, S. R., & Mcdermott, P. F. (2021). A National Antimicrobial Resistance Monitoring System Survey of Antimicrobial-Resistant Foodborne Bacteria Isolated from Retail Veal in the United States. *Journal of Food Protection*, *84*(10), 1749–1759. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-005>
- Teng, K. T., Aerts, M., Jaspers, S., Ugarte-Ruiz, M., Moreno, M. A., Saez, J. L., Collado, S., de Frutos, C., Dominguez, L., & Alvarez, J. (2022). Patterns of antimicrobial resistance in Salmonella isolates from fattening pigs in Spain. *BMC Veterinary Research*, *18*(1), 333. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03377-3>
- Tolosi, R., Carraro, L., Laconi, A., & Piccirillo, A. (2021). Optimization of five qPCR protocols toward the detection and the quantification of antimicrobial resistance genes in environmental samples. *MethodsX*, *8*, 101488. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101488>
- Turcotte, C., Thibodeau, A., Quessy, S., Topp, E., Beauchamp, G., Fravallo, P., Archambault, M., & Gaucher, M.-L. (2020). Impacts of Short-Term Antibiotic Withdrawal and Long-Term Judicious Antibiotic Use on Resistance Gene Abundance and Cecal Microbiota Composition on Commercial Broiler Chicken Farms in Québec. *Frontiers in Veterinary Science*, *7*, 547181. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.547181>
- Venkatesan, M., Fruci, M., Verellen, L. A., Skarina, T., Mesa, N., Flick, R., Pham, C., Mahadevan, R., Stogios, P. J., & Savchenko, A. (2023). Molecular mechanism of plasmid-borne resistance to sulfonamide antibiotics. *Nature Communications*, *14*(1), 4031. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39778-7>
- World Health Organization. (2019). *Critically Important Antimicrobials for Human Medicine* (6th rev.). World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/312266>
- Xu, C., Kong, L., Liao, Y., Tian, Y., Wu, Q., Liu, H., & Wang, X. (2022). Mini-Review: Antibiotic-Resistant Escherichia coli from Farm Animal-Associated Sources. *Antibiotics*, *11*(11), 1535. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111535>
- Xu, Z., Deng, Y., Zhao, X., Hanh, N. T. T., & Waisundara, V. Y. (2021). Editorial: Emerging Frontiers in the Formation of Viable but Non-culturable Microorganisms and Biofilms During Food Processing. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 726348. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.726348>
- Zahari, N. I. N., Engku Abd Rahman, E. N. S., Irekeola, A. A., Ahmed, N., Rabaan, A. A., Alotaibi, J., Alqahtani, S. A., Halawi, M. Y., Alamri, I. A., Almogbel, M. S., Alfaraj, A. H., Ibrahim, F. A., Almaghaslah, M., Alissa, M., & Yean, C. Y. (2023). A Review of the Resistance Mechanisms for β -Lactams, Macrolides and Fluoroquinolones among Streptococcus pneumoniae. *Medicina*, *59*(11), 1927. <https://doi.org/10.3390/medicina59111927>
- Zalewska, M., Błażejewska, A., Czapko, A., & Popowska, M. (2021). Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Animal Manure – Consequences of Its Application in Agriculture. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 610656. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.610656>

- Zheng, Y., Yu, Q., Han, L., & Chen, X. (2024). Molecular Characterization of Resistance and Virulence Factors of *Trueperella pyogenes* Isolated from Clinical Bovine Mastitis Cases in China. *Infection and Drug Resistance*, *Volume 17*, 1979–1986. <https://doi.org/10.2147/IDR.S433578>
- Zhou, G., Wang, Q., Wang, Y., Wen, X., Peng, H., Peng, R., Shi, Q., Xie, X., & Li, L. (2023). Outer Membrane Porins Contribute to Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Microorganisms*, *11*(7), 1690. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071690>
- Zhu, T., Chen, T., Cao, Z., Zhong, S., Wen, X., Mi, J., Ma, B., Zou, Y., Zhang, N., Liao, X., Wang, Y., & Wu, Y. (2021). Antibiotic resistance genes in layer farms and their correlation with environmental samples. *Poultry Science*, *100*(12), 101485. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101485>