



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
ESPECIALIDAD EN DIAGNÓSTICO MOLECULAR
POSGRADO EN RECURSOS BIÓTICOS

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE PLÁSMIDOS DE UNA COLECCIÓN
DE CEPAS DE *Escherichia coli*.

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencias.

Presenta:
Biol. Gerardo Armando Soto Alonso.

Dirigido por:
Dr. Juan Campos Guillen.

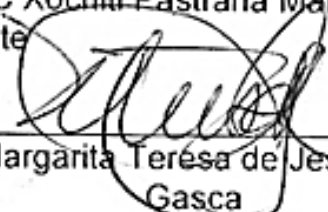
Dr. Juan Campos Guillen
Presidente


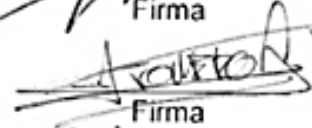

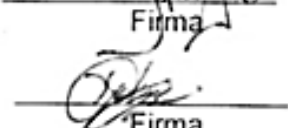
Dr. Sergio de Jesús Romero
Secretario

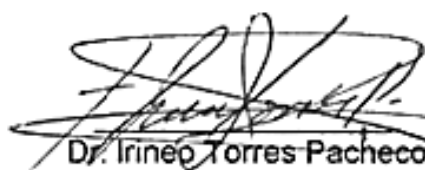
Dr. Andrés Hernández Cruz
Vocal

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez
Suplente

M. en C. Xóchitl Pastrana Martínez
Suplente


Dra. Margarita Teresa de Jesús García
Gasca
Director de la Facultad


Firma

Firma

Firma

Firma


Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

Campus Aeropuerto
Querétaro Qro
A Diciembre del 2014
México



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE PLÁSMIDOS DE UNA COLECCIÓN
DE CEPAS DE *Escherichia coli*.**

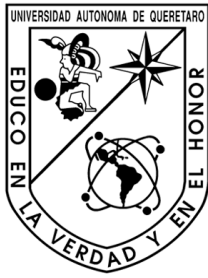
TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Recursos
Bióticos.

Presenta:

Biol. Gerardo Armando Soto Alonso

Santiago de Querétaro, Querétaro, Diciembre de 2014



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
ESPECIALIDAD EN DIAGNÓSTICO MOLECULAR
POSGRADO EN RECURSOS BIÓTICOS

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE PLÁSMIDOS DE UNA COLECCIÓN
DE CEPAS DE *Escherichia coli*.**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencias.

Presenta:

Biol. Gerardo Armando Soto Alonso.

Dirigido por:

Dr. Juan Campos Guillen.

Dr. Juan Campos Guillen
Presidente

Firma

Dr. Sergio de Jesús Romero
Secretario

Firma

Dr. Andrés Hernández Cruz
Vocal

Firma

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez
Suplente

Firma

M. en C Xóchitl Pastrana Martínez
Suplente

Firma

Dra. Margarita Teresa de Jesús García
Gasca
Director de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y
Posgrado

Campus Aeropuerto
Querétaro Qro
A Diciembre del 2014
México

RESUMEN

Escherichia coli (*E. coli*) es una de las especies causantes de diarreas que requiere especial atención ya que frecuentemente es aislada de organismos enfermos. Las características patogénicas y de resistencia a antibióticos generan un problema en el control sanitario, además el uso indiscriminado de antibióticos en el ganado como factores de crecimiento o de prevención genera una presión selectiva entre las bacterias presentes en el organismo, provocando la aparición y mantenimiento de bacterias multi-resistentes. Esta resistencia generalmente se encuentra en plásmidos que pueden ser transmitidos de bacteria a bacteria. El análisis de estos elementos móviles, pueden ser utilizados como herramientas moleculares para generar relaciones entre organismos detectando y evaluando el modo de diseminación de estos patógenos multi-resistentes. La escases de este tipo de información no nos permite tener un mejor conocimiento del comportamiento de estos organismos y por lo tanto es fácil que un brote infeccioso pueda sorprendernos en humanos y animales. Debido a esto el objetivo de este trabajo fue obtener información genética y bioquímica de una colección de cepas de *E. coli* aisladas de ganado enfermo. Para lograrlo se llevaron a cabo patrones plasmídicos en geles de agarosa, pruebas de resistencia a antibióticos de uso común, identificación a nivel de especie de las cepas por los métodos del Kit de Biolog, MALDI-TOF y 16S rDNA, y la secuenciación del plásmido obtenido de la cepa CM6. Los resultados mostraron que las diez cepas corresponden a especies de *E. coli*. Las cepas muestran resistencia a los antibióticos de uso común, sin embargo se observó sensibilidad a algunos de ellos y las pruebas bioquímicas muestran diferencia entre las cepas, dejándonos observar que dos de ellas, la cepa CM5 y CM6 tienen perfiles muy similares. Esta información nos ha dejado conocer la “*Huella digital*” de estas cepas y así la posibilidad de reconocer su comportamiento en futuros casos infecciosos.

Palabras clave: *Enterobacteriaceae*, secuencias, resistencia antibiótica.

SUMMARY

Escherichia coli (*E. coli*) is one of the species of causing diarrhea that requires special attention because it is frequently isolated from diseased organisms. The pathogenic and antibiotic resistance characteristics create a problem in the sanitary control, also the indiscriminate use of antibiotics in livestock as growth factors or prevention generates a selective pressure among bacteria present in the body, causing the onset and maintenance of multi-resistant bacteria. This resistance is usually found on plasmids that can be transferred from bacteria to bacteria, analysis of these mobile elements can be used as molecular tools to build relationships among organisms by detecting and evaluating the mode of spread of these multi-resistant pathogens. The scarcity of this type of information does not allow us to have a better understanding of the behavior of these organisms and therefore it is easy for an outbreak may surprise in humans and animals. Because of this, the aim of this study was to obtain genetics and biochemistry characteristics of a collection of strains of *E. coli* isolated from sick cattle information. To achieve were conducted plasmid profiles on agarose gels were obtained, antibiotics resistance tests, identification of the strains by the methods Biolog Kit, MALDI-TOF and 16S rDNA, and sequencing of the plasmid CM6 obtained from the strain. The results showed that correspond to the ten strains of *E. coli* species. Strains showing resistance to commonly used antibiotics, however sensitivity was observed at some of them and biochemical tests show differences between strains, leaving us note that two of them, the CM5 and CM6 strain have very similar profiles. This information has made us to know the "fingerprint" of these strains and thus the ability to recognize their behavior in future infectious cases.

Key words: *Escherichia coli*, plasmids, antibiotics resistance.

DEDICATORIAS

A mi hermosa familia que a diario me impulsa a mejorar física y emocionalmente.

A mi esposa Nadia que ha encontrado la forma de darme tranquilidad para escribir mi Tesis y que está a mi lado de manera incondicional.

A mi hermoso hijo Mateo, que con su incomparable sonrisa me hace sentir lleno de alegría.

A mis padres y hermano que me han visto crecer académicamente y aun siguen apoyándome en lo que pueda necesitar.

"La clave para la inmortalidad es principalmente vivir una vida que valga la pena recordar".

Bruce Lee.

AGRADECIMIENTOS

“El agradecimiento principal es al creador por darme las fuerzas y el ánimo en momentos difíciles”.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por permitirme ser parte de ella y darme una segunda casa en la cual el objetivo siempre ha sido superarme.

Al Dr. Juan Campos Guillen que siempre ha estado en la mejor disposición para orientarme, impulsarme, por ayudarme a ver que no hay limitantes cuando tenemos metas en la vida.

Al Dr. Andrés Cruz Hernández, por su apoyo incondicional durante estos años tanto en su laboratorio, en el salón de clases y fuera de la institución.

Al Dr. Sergio de Jesús Romero por su guía como docente, Doctor, maestro y amigo.

Al Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez por su pronta atención y asesoría en mi trabajo, además de su agradable compañía durante estos años.

A la M. en C. Xóchitl Pastrana Martínez por su apoyo constante e incondicional en el laboratorio y en la revisión de mi tesis.

Al M. en C. Julio Cruz Medina por su ayuda en el laboratorio, en el salón de clases y por darme siempre consejos valiosos.

Al programa de becas CONACYT.

A los proyectos que me facilitaron los medios para llevar a cabo mi proyecto, Foper 2013, Fovin 2014 y a los fondos de FORDECY (número 193512).

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|--------|
| RESUMEN..... | - 1 - |
| SUMMARY | - 2 - |
| DEDICATORIAS..... | - 3 - |
| AGRADECIMIENTOS..... | - 4 - |
| ÍNDICE GENERAL..... | - 5 - |
| ÍNDICE DE TABLAS | - 7 - |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | - 8 - |
| INTRODUCCIÓN..... | - 9 - |
| ANTECEDENTES | - 12 - |
| Familia <i>Enterobacteriaceae</i> | - 12 - |
| Estructura antigénica | - 12 - |
| Importancia clínica | - 13 - |
| Efecto negativo de las Enterobacterias | - 14 - |
| <i>Escherichia coli</i> | - 15 - |
| El problema de la resistencia a antibióticos | - 16 - |
| Resistencia bacteriana | - 17 - |
| Efectos del mal uso de los antibióticos | - 19 - |
| Uso del antibiótico en el ganado..... | - 21 - |
| Adquisición de la resistencia a antibióticos | - 24 - |
| Transferencia vertical..... | - 24 - |
| Transferencia horizontal..... | - 25 - |
| Plásmidos: Reservorios de la resistencia microbiana. | - 26 - |
| ¿Qué son los plásmidos?..... | - 26 - |
| Incompatibilidad plasmídica..... | - 27 - |
| Plásmidos como marcadores | - 28 - |
| Métodos moleculares como herramienta..... | - 28 - |
| JUSTIFICACIÓN..... | - 30 - |

| | |
|---|--------|
| HIPÓTESIS | - 31 - |
| OBJETIVOS | - 31 - |
| General. | - 31 - |
| Particulares..... | - 31 - |
| METODOLOGÍA..... | - 31 - |
| Aislamiento de las cepas y extracción de plásmidos..... | - 31 - |
| Preparación para la secuenciación. | - 32 - |
| Limpieza por Fenol-Cloroformo..... | - 32 - |
| Construcción de la Genoteca | - 33 - |
| Extracción y purificación del plásmido | - 33 - |
| Digestión del material plasmídico | - 34 - |
| Clonación..... | - 34 - |
| Transformación..... | - 34 - |
| BIOLOG: Gen II MicroPlate | - 35 - |
| Prueba de resistencia a antibióticos..... | - 36 - |
| RESULTADOS..... | - 38 - |
| Identificación | - 38 - |
| Perfiles plasmídicos. | - 38 - |
| Ensamblajes y análisis de secuencias..... | - 40 - |
| Genoteca. | - 40 - |
| Fuentes de Carbono: Kit Biolog | - 42 - |
| Pruebas de resistencia a antibióticos..... | - 46 - |
| DISCUSIÓN..... | - 50 - |
| REFERENCIAS | - 56 - |

ÍNDICE DE TABLAS

| Tabla | Descripción | Página |
|--------------|--|---------------|
| 1 | Especies más comunes que presentan resistencia. | 11 |
| 2 | Fármacos y concentración. | 27 |
| 3 | Identificación de los aislados. | 29 |
| 4 | Fuentes de carbono que componen el Kit Biolog. | 33 |
| 5 | Fuentes de carbono utilizadas por los aislados. | 34 |
| 6 | Genes en la cepa CM6 | 39 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | Descripción | Página |
|---------------|--|---------------|
| 1 | Factores que pueden causar resistencia microbiana. | 18 |
| 2 | Mecanismos de adquisición de resistencia microbiana. | 21 |
| 3 | Acomodo de las cepas y antibióticos en la microplaca. | 36 |
| 4 | Patrones plasmídicos. | 38 |
| 5 | Genoteca. | 39 |
| 6 | Genoteca. | 39 |
| 7 | Genoteca. | 40 |
| 8 | Susceptibilidad a los antibióticos. | 45 |

INTRODUCCIÓN

El tema del surgimiento de micro-organismos multi-resistentes es cada vez más extenso debido al impacto a la salud y a la economía que puede generar en cualquier parte del mundo. Los géneros más sobresalientes de la familia *Enterobacteriaceae* más comunes causantes de enfermedades infecciosas son *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Escherichia coli* (*E. coli*). Estos géneros son de importancia clínica debido a que son los causantes de brotes infecciosos de manera frecuente, estas infecciones pueden ser entéricas o extraintestinales (Llop *et al*, 2001). La clasificación de esta familia se ha logrado mediante caracterizaciones metabólicas propias de cada género, esto ayuda a distinguir su comportamiento y por lo tanto orientar un tratamiento médico (Llop *et al*, 2001, Hale y Keusch, 1996). No todos los géneros de esta familia provocan un efecto negativo en los organismos, sin embargo aquellas que comprometen la integridad de un individuo o hasta una población como *E. coli* (patógeno más aislado, del 50-90%) pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*.

Particularmente *E. coli* es el organismo más aislado en infecciones intestinales, y se ha clasificado en *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enterotóxicogénica (ECET), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), *E. coli* enteroagregativa (ECEA), *E. coli* difusamente adherente (ECDA) (Llop *et al*, 2001). Esta clasificación se ha llevado a cabo ya que sus variantes necesitan ser diferenciadas de aquellas que no son patógenas y habitan en la flora normal, es por esto que la identificación de los miembros no patógenos deben ser detectados determinando la virulencia de las cepas patógenas mediante el conocimiento de los genes que les dan estas características como la de resistencia a antibióticos, conjugación de sus plásmidos o toxicidad (Toma *et al.*, 2003).

Independientemente del efecto tóxico o invasivo que las cepas de *E. coli* pueden generar en el organismo, otro factor como el de resistencia a antibióticos puede darle a los microorganismos una ventaja ecológica, La resistencia a antimicrobianos se ha vuelto un problema mundial que pone en riesgo el

tratamiento efectivo de las infecciones bacterianas y aunque en algún momento el tratamiento con antibióticos era muy prometedor actualmente se habla de la “era post-antibiótica” (Jones y Pfaller, 1983, Falagas y Bliziotis, 2007). Con frecuencia los estudiosos están en busca de nuevos antibióticos, pero esto no es más que una lucha por sobrevivir, lo que genera una fuerza selectiva que lleva al camino de la adaptación al medio. Estos microorganismos tienen una gran variedad de patrones de sensibilidad a los antibióticos, por lo tanto los tratamientos que serán aplicados deben estar orientados por investigaciones provenientes de laboratorios (Gross, 1998).

Esta resistencia bacteriana cuenta con 5 mecanismos para eliminar el antibiótico, 1) resistencia natural; 2) reduciendo la concentración intracelular del antibiótico (bombas de eflujo, 3) inactivando el fármaco (alteración de la enzima, 4) mutaciones en los puntos de unión de los antibióticos correspondientes, 5) formación de vías metabólicas adicionales (Kaye, *et al* 2000). Estos procesos no son nuevos en las bacterias, ya que por mucho tiempo han tenido que enfrentar la presencia de sustancias que inhiben la formación de sus componentes celulares, procesos que se llevan a cabo de manera equilibrada entre bacterias y hongos por ejemplo, sin embargo el hombre ha generado un desequilibrio en este sentido, Desde el comienzo del uso de los antibióticos en la década de los 40 los estudiosos de la microbiología comenzaron a detectar resistencia a las que en ese tiempo llamaban “drogas milagrosas”, la penicilina fue por muchos años el único fármaco utilizado para atacar infecciones, el resultado del uso de antibióticos se veía bien ya que tratamientos interrumpidos o subinhibitorios resultaban en beneficio para seleccionar bacterias resistentes y promover su crecimiento (Llop *et al*, 2001). En algunos de los casos donde estas prácticas son muy comunes es en el mantenimiento del ganado, los antibióticos son utilizados para mejorar el crecimiento y reducir el riesgo de infecciones, también mejoran la digestión y la cantidad de alimento necesario para que los animales lleguen a un peso adecuado (Crawford y Teske, 1983; Droumev, 1983; Frost, 1991). El hecho en estos procesos es que los antibióticos están presentes en el ambiente, generando incontables modificaciones en las interacciones bacterianas.

Pero esta característica de resistencia no se limita a un grupo de bacterias, la resistencia puede diseminarse fácilmente mediante material extracromosómico móvil llamado plásmido. Los plásmidos son considerados vectores de la movilización genética mediante la transformación, transducción y conjugación (siendo esta última la más usual) en poblaciones incluso de diferentes especies, siendo capaces de transmitirlo de bacteria a levadura (Summers 1996; Couturier *et al.* 1998). Esto nos hace pensar que la velocidad de propagación de la resistencia a antibióticos puede estar más allá de nuestra capacidad para detectar y contener micro-organismos patógenos.

Es aquí cuando podemos aprovechar estos elementos móviles para usarlos para detectar los perfiles de resistencia, seleccionar los fármacos adecuados y trazar la dispersión de cepas individuales, más específicamente utilizarlos como un marcador molecular para cepas bacterianas (Sader *et al.*, 1995). La caracterización molecular de microorganismos es frecuentemente usada por médicos, microbiólogos y epidemiólogos para proveer evidencia de la relación genética como ayuda en la investigación epidemiológica de las enfermedades infecciosas (Sader *et al.*, 1995).

Debido a las razones expuestas aquí, se determinó caracterizar genética y bioquímicamente una colección de cepas de *E. coli* responsable de infecciones en ganado, conocer esta información contribuirá al conocimiento del comportamiento de estas cepas en su medio ambiente.

ANTECEDENTES

Familia *Enterobacteriaceae*

La familia *Enterobacteriaceae* está formada por bacilos gram-negativos con un tamaño entre 0.5-2 μm y 4-5 μm de longitud, no esporulados, fermentan y oxidan la glucosa, anaerobios facultativos, reducen los nitratos a nitritos y no tienen indol fenol oxidasa. Muchas de las especies de las Enterobacterias se encuentran distribuidas en el hombre y los animales, aunque también pueden parasitar plantas o tener vida saprófita. Pueden o no tener movilidad, los flagelos peritricos les confieren el movimiento, con excepción de los géneros de *Shigella* y *Klebsiella*. (Madigan *et al*, 2003, Hale y Keusch, 1996).

Los géneros que forman la familia *Enterobacteriaceae* se engloba en 47 géneros y un conjunto de Enterobacterias aun no identificadas con una homología estructural y fisiológica elevada (Madigan *et al*, 2003). Los géneros más comunes que causan enfermedades infecciosas según Farmer y laboratorios de bacteriología entérica son *Budvicia*, *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia-Shigella*, *Ewingella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Koserella*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Moellerella*, *Morganella*, *Obesumbacterium*, *Pragia*, *Proteus*, *Providencia*, *Rhanella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Tatumella*, *Xenorhabdus*, *Yersinia* (Llop *et al*, 2001).

Estructura antigénica

Una característica de importancia en la familia *Enterobacteriaceae* son los antígenos somáticos (O), estos determinan los grupos serológicos, gracias a esto se han identificado cerca de 150 de antígenos formados por lipopolisacáridos que tienen como característica ser termo estables que pueden ser detectados, todos los géneros de las Enterobacterias contienen antígenos O que son específicos, sin embargo pueden estar presentes más de un antígeno O en un solo microorganismo. Existen otros tipos de antígenos como el K, estos actúan como

adhesinas y tienen un papel importante en la virulencia de la cepa, por ejemplo el antígeno K1 está presente en *E. coli* que produce meningitis en los neonatos. Este tipo de antígenos pueden ser detectados por reacciones de aglutinación o reacción de hinchazón de la cápsula mediante anticuerpos específicos, los antígenos M se encuentran en Enterobacterias como *Salmonella* presentes en antígenos de cubierta, el antígeno Vi es somático externo y se encuentra en bacterias como *Salmonella typhi*, *E. coli* y *Citrobacter*. Los antígenos H están relacionados con los flagelos en las cepas móviles y se ha logrado identificar más de 50 antígenos (Llop *et al*, 2001).

Importancia clínica

Las especies que se encuentran en esta familia son las que se identifican más frecuentemente en laboratorios de microbiología clínica, reportando causas de infecciones entéricas o bien fuera del tracto intestinal (intestinal y extraintestinal). No todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae* se encuentran como frecuentes causas de infecciones solo aproximadamente 25 especies han sido confirmadas como patógenas para el hombre (Llop *et al*, 2001).

Para identificar y clasificar a esta familia se lleva a cabo en función de sus diferencias metabólicas que cada género presenta, como ejemplo, fermentar lactosa es una característica común en bacterias comensales del intestino de humanos y animales a diferencia de bacterias patógenas como *Shigella* spp., *Salmonella* spp. *Yersinia* spp, las cuales no son capaces de fermentar lactosa, su identificación se ha basado también en características propias como el fenotipo y estudios serológicos, aunque actualmente existen otros métodos para su clasificación, como su carga antigénica, hibridación de DNA y análisis computarizados, análisis de resistencia a antibióticos, presencia de toxinas, reacciones bioquímicas (Llop *et al*, 2001, Hale y Keusch, 1996).

Si bien las Enterobacterias se han considerado en la mayoría de sus géneros como bacterias comensales del tracto intestinal de humanos y animales, hay

algunos géneros que se portan como patógenos oportunistas, comprometiendo seriamente la salud al organismo, causando infecciones en tracto respiratorio y urinario además del sistema nervioso e intestinos, algunos géneros que destacan por ser serios patógenos son *Salmonella* ssp., *Yersinia* ssp. y algunas cepas de *Escherichia coli* la cual ha sido clasificada en función de su toxicidad.

Desde el descubrimiento de los antibióticos, han sido ampliamente utilizados como un tratamiento eficaz para tratar infecciones causadas por géneros de la familia Enterobacteriaceae, sin embargo el amplio uso de estos medicamentos ha generado una presión selectiva que ha dado como resultado desde los años 40 una selección de bacterias resistentes a todo tipo de antimicrobiano natural o hasta sintético. Este problema no lo solo abarca a los humanos, sino existe de manera alarmante también en los animales de granja, el problema es creciente debido a la administración de antibacterianos a concentraciones subterapéuticas, o bien utilizados a modo de profilaxis o como promotores de crecimiento en los alimentos sin ninguna prescripción veterinaria (Guardabassi y Courvalin, 2006).

Efecto negativo de las Enterobacterias

Las infecciones nosocomiales son cada vez más relevantes debido a las consecuencias económicas, sociales y de salud que afectan a individuos o poblaciones que las padecen (Ramos y Pelez, 1991), las infecciones intrahospitalarias causadas por Enterobacterias representan un indicador en la calidad de atención debido a su frecuencia y gravedad, por lo tanto reflejan el resultado de las acciones del equipo de las áreas de la salud (Guinan *et al.* 2005). Las Enterobacterias en particular representan la principal causa de infecciones, entre las más comunes se encuentran *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Enterobacter* spp (Navarrete y Pérez, 1998, Díaz *et al.* 2001).

Las infecciones que provocan los miembros de esta familia se pueden clasificar como intestinales o extraintestinales de acuerdo a la localización. Se ha descrito que las infecciones intestinales son producidas por seis clases de *E. coli*

clasificadas como patógenas entéricas, las cuales son: *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), *E. coli* enteroagregativa (ECEA), *E. coli* difusamente adherente (ECDA) y las infecciones producidas por *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia enterocolitica*. Otros géneros que se han vinculado en menor medida con la producción de diarreas son *Citrobacter*, *Proteus*, *Morganella*, *Enterobacter*, *Hafnia* y *Serratia* (Llop et al, 2001).

Escherichia coli

E. coli fue nombrada así (*Bacterium coli commune* anteriormente) después de que el Alemán Theodor Escherich la describiera por primera vez en el año de 1885 como un microorganismo que habita de manera esencial en la microbiota del intestino de organismos sanos de sangre caliente, manteniendo así la salud del hospedero (Kaper. 2005).

E. coli de manera usual permanece en el lumen intestinal si causar daño, sin embargo si el organismo se encuentra comprometido inmunológicamente, debilitado o se rompe la barrera gastrointestinal, *E. coli* aún sin ser patógena puede causar daños. Las infecciones debido a patógenos de *E. coli* pueden limitarse a la mucosa intestinal o bien causar infecciones extraintestinales, debido a esto se han clasificado tres síndromes como resultado de la invasión por cepas de *E. coli*: 1) infecciones del tracto urinario (95% de estas infecciones son causadas por *E. coli*), 2) septicemia/meningitis y 3) enfermedades entéricas (Nataro y Kaper, 1998, Llop et al, 2001).

E. coli es la especie tipo del género *Escherichia* la cual cuenta con bacilos gram-negativos ubicados dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, (55, 185). *E. coli* puede aislarse en medio general o medio selectivo a 37°C bajo condiciones aeróbicas, pero es más frecuente recuperarla en medio MacConkey o Eosina (32), géneros de *Enterobacteriaceae* pueden ser identificados mediante pruebas bioquímicas comerciales obteniendo resultados confiables (Nataro y Kaper, 1998).

Las cepas de *E. coli* causantes de diarreas requieren ser diferenciadas de aquellas que no son patógenas y habitan en la flora normal, es por esto que la identificación de los miembros no patógenos sean detectados determinando la virulencia de las cepas patógenas (Toma *et al.*, 2003).

El problema de la resistencia a antibióticos

De manera constante emergen cepas resistentes causantes de infecciones nosocomiales que causan graves problemas, por lo tanto los estudiosos como los microbiólogos, médicos y epidemiólogos deben estar alertas con el comportamiento de esta familia y el uso de los antibióticos (Llop *et al.*, 2001). Factores como el amplio uso de los antibióticos, el aumento de la expectativa de vida y el medio ambiente en unidades hospitalarias incrementan la resistencia bacteriana a los distintos antimicrobianos y por lo tanto las enfermedades nosocomiales (Owens y Rice, 2006).

La resistencia a antimicrobianos se ha vuelto un problema mundial que pone en riesgo el tratamiento efectivo de las infecciones bacterianas y aunque en algún momento el tratamiento con antibióticos era muy prometedor actualmente se habla de la “era post-antibiótica” (Jones y Pfaller, 1983, Falagas y Bliziotis, 2007). Estos microorganismos tienen una gran variedad de patrones de sensibilidad a los antibióticos, por lo tanto los tratamientos que serán aplicados deben estar orientados por investigaciones provenientes de laboratorios (Gross, 1998).

Algunos factores que influyen en el desarrollo de la resistencia microbiana es el uso excesivo e incorrecto de los antibióticos durante la profilaxis y tratamientos de infecciones virales, así como la venta de los fármacos sin restricciones y en el uso agropecuario (World Health Organization, 2002), las consecuencias de un mal uso de los antibióticos puede verse reflejada en una mayor morbilidad, prolongación en la estancia hospitalaria, mayores costos para el sistema de salud y la contribución a generar resistencia bacteriana. Se conoce que al usar concentraciones subinhibitorias de antibióticos crea una presión de selección de aquellas cepas

que son resistentes sobre las que no cuentan con esta ventaja (Gilber *et al.*, 2001).

El desarrollo de resistencia a antibióticos básicos como lo son la ampicilina y la trimetoprima-sulfametoxazol, es un problema emergente de resistencia a las fluoroquinolonas y de manera importante limita las decisiones de que antibiótico utilizar (Karlowsky *et al.*, 2002).

Resistencia bacteriana

Las bacterias cuentan con distintos mecanismos para resistir la presencia de antibióticos, actualmente se han descrito al menos 5 diferentes, 1) resistencia natural; 2) reduciendo la concentración intracelular del antibiótico (bombas de eflujo, 3) inactivando el fármaco (alteración de la enzima, 4) mutaciones en los puntos de unión de los antibióticos correspondientes, 5) formación de vías metabólicas adicionales (Kaye, *et al* 2000).

Las células bacterianas con resistencia natural a un antibiótico en particular carecen de la molécula o vía blanco de la droga, también las bacterias pueden llegar a ser resistentes a los antibióticos reduciendo la concentración intracelular del fármaco lo cual puede llevarse a cabo mediante la reducción de la permeabilidad de la membrana plasmática, disminuyendo el importe y aumentando el exporte, se sabe que los solutos hidrofílicos se difunden dentro de las bacterias principalmente mediante las porinas, en las bacterias mutantes que les faltan las porinas pueden presentar un amplio espectro de resistencia, por ejemplo, la disminución de la permeabilidad es causa de resistencia en *Haemophilus influenzae* y *Pseudomonas cepacia* (Burns, *et al* 1989, Burns, *et al* 1985). Las bombas de eflujo dependientes de energía son otro mecanismo para reducir la concentración de antibiótico dentro de la célula, estas bombas pueden ser específicas o puede exportar diferentes tipos de antibióticos. La combinación de la reducción de la permeabilidad de la membrana y la función de las bombas da lugar a organismos altamente resistentes, por ejemplo, se ha descubierto que

activar bombas y la disminución del número de porinas en las membrana a contribuido a la resistencia a Cloramfenicol (Cm) en algunas cepas de *Enterobacter* (Gayet, *et al*, 2003).

Como ya se comentó la inactivación de los antibióticos se puede dar por la degradación o la modificación, un ejemplo de la inactivación son las β -lactamasas, las cuales están presente en muchas especies, las β -lactamasas son capaces de hidrolizar los anillos β -lactámicos, inactivando su actividad antimicrobiana. Se han descrito cuatro clases (A, B, C, D) de β -lactamasa, cada una con su propia secuencia de nucleótidos y ciertos tipos de lactamasas confieren resistencia a varios tipos de antibióticos β -lactámicos mientras que otros solo confieren resistencia a uno solo, por otro lado los antibióticos son modificados, como ejemplo se encuentran los aminoglucósidos que pueden modificar la fosfotransferasa y acetiltransferasa perdiendo su capacidad de unión a la subunidad ribosomal (Shaw, *et al* 1993). También los patógenos resistentes modifican aminoglucósidos usando metilasas, acetiltransferasa, nucleotidiltransferasa y fosfotransferasas, por ejemplo, el cloramfenicol es inactivado por la acetilación catalizada por la cloramfenicol acetiltransferasa de organismos resistentes (Ruiz, 2003).

Otra de las estrategias para la resistencia es modificar los sitios de reconocimiento del antibiótico en la estructura intracelular de las bacterias por lo que el antibiótico ya no puede ser identificado, este mecanismo está relacionado con el desarrollo de resistencia a varios tipos de antibióticos como las quinolonas (mutaciones en sitios de la DNA girasa), tetraciclinas y macrólidas (mutaciones en las subunidades de los ribosomas) (Ruiz, 2003). Se ha encontrado que la formación de vías alternativas de metabolismo es responsable de la resistencia a antibióticos que atacan rutas metabólicas básicas para el mantenimiento de la célula bacteriana, como ejemplo tenemos las sulfamidas, ya que compiten con el ácido para-aminobenzoico (PABA), este sustrato se encuentra dentro de la síntesis de nucleótidos, se ha observado que esta acción puede ser contra restada mediante la sobreproducción de PABA (Ruiz, 2003).

Existen varios factores que pueden llevar a que el uso de los antibióticos den lugar a la resistencia bacteriana (Figura 1), por ejemplo se ha demostrado que existe una asociación entre el uso a largo plazo de fármacos beta-lactámicos orales con la presencia de resistencia a penicilina de *Streptococcus pneumoniae* comparado con tratamientos cortos y con dosis adecuadas (Barbosa y Levy, 2000).

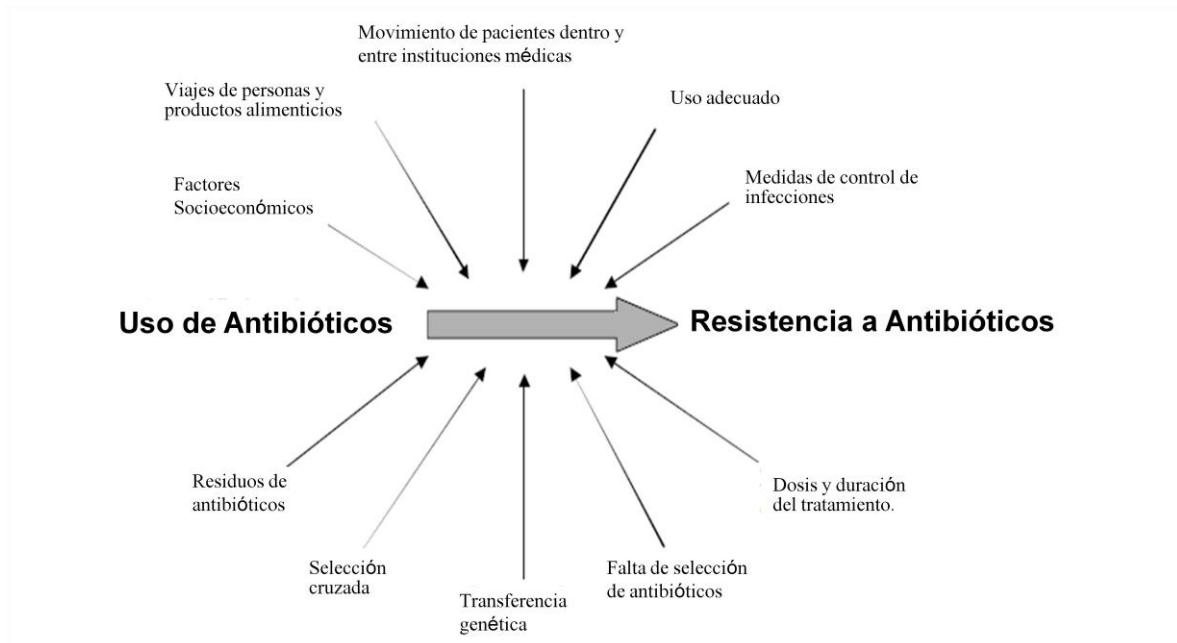


Figura 1. Factores que pueden causar resistencia microbiana. Muestra la relación entre el uso de los antibióticos y el desarrollo de la resistencia. La principal causa es el uso de los antibióticos sumado a factores externos. La flecha horizontal representa la resistencia directa, las demás flechas los factores externos.

Efectos del mal uso de los antibióticos

Desde el comienzo del uso de los antibióticos en la década de los 40 los estudiosos de la microbiología comenzaron a detectar resistencia a las que en ese tiempo llamaban “drogas milagrosas”, la penicilina fue por muchos años el único fármaco utilizado para atacar infecciones, por lo tanto Alexander Fleming en 1945 ya advertía que el mal uso de la penicilina (en condiciones de laboratorio) ocasionaba selección y propagación de organismos mutantes, es por esto que promovió tratamientos completos , ya que tratamientos interrumpidos o

subinhibitorios resultaban en beneficio para seleccionar bacterias resistentes y promover su crecimiento (Llop *et al*, 2001). A través de los años el temor de Fleming se ha hecho más que realidad, se han generado resistencias a un sin número de antibióticos (Tabla 1, modificada de Pfaller, 1998).

Tabla 1. Especies más comunes que presentan resistencia. Muestra los diferentes tipos de organismos bacterianos y a qué tipo de antibiótico son resistentes (modificada de Jones y Pfaller, 1998).

| Organismos | Resistencias |
|---|--|
| Gram-positivas Estafilococos | Penicilina, Oxacilina, Macrólidos |
| Enterococo | Glycopeptidos, Penicilinas, Aminoglucósidos |
| Streptococo | Penicilina, Macrólidos, algunas Cefalosporinas |
| <i>Corynebacterium</i> spp. <i>Bacillus</i> spp. | Drogas múltiples β -Lactamasas |
| Gram-negative <i>Haemophilus</i> spp. <i>M. catarrhalis</i> <i>Klebsiella</i> spp. | Penicilinas (β -Lactamasas) β -Lactamasas (β -Lactamasas) Nuevas Cefalosporinas (β -Lactamasas de amplio espectro) |
| <i>Enterobacter</i> spp | Nuevas Cefalosporinas β -Lactamasas de amplio espectro |
| <i>S. maltophilia</i> <i>Neisseria</i> spp. | Drogas múltiples β -Lactamasas, Fluoroquinolonas |
| <i>Acinetobacter</i> spp. | Drogas múltiples |
| <i>Pseudomonas</i> spp. | Drogas múltiples |
| <i>Bacteroides fragilis</i> group | Clindamicinas, Cefamicinas |

En la actualidad el surgimiento de la resistencia a los antibióticos es un hecho que no se ha podido controlar y afecta a todos los individuos y poblaciones alrededor del mundo, la mala aplicación y el abuso de los antibióticos en hogares, hospitales, comunidades, en la agricultura y en *los animales* ayudan de manera

consistente a seleccionar y mantener cepas de bacterias resistentes, esta resistencia puede extenderse grandes distancias, rápidamente pueden dar la vuelta por el mundo, por lo tanto los antibióticos serán los agentes más importantes para seleccionar y propagar bacterias resistentes, por lo tanto es de primordial importancia el uso cuidadoso de los fármacos (Llop *et al*, 2001). El efecto nocivo del mal uso de los antibióticos va más allá de un individuo, la selección es sobre el medio ambiente y la aparición de bacterias resistentes ejerce serios efectos sobre la población, sin embargo la selección de la resistencia se da en cada usuario y esas bacterias no son capaces, directamente de causar enfermedad a su portador, pero su resistencia es con frecuencia transferida a bacterias patógenas para el hombre.

Uso del antibiótico en el ganado

Los antibióticos son ampliamente usados en la ganadería como tratamientos terapéuticos, promotores de crecimiento y profilaxis. Antibióticos usados como promotores de crecimiento son administrados a bajas dosis por largos espacios de tiempo, en la profilaxis, los antibióticos son usados de igual manera a bajas concentraciones para tratar enfermedades, la diferencia de uso como promotor o profilaxis es la duración con la que se le aplica, sin embargo en ambos casos las dosis son consideradas como subterapéuticas (IOM, 1989).

El extenso uso de antibióticos en la ganadería se ha vuelto un problema debido a la transmisión de la resistencia, se ha llegado a observar que 24 tipos de agentes microbianos han sido usados de manera extensa en granjas y ganados como promotores de crecimientos y profilaxis, estos fármacos fueron frecuentemente usados para tratar enfermedades como neumonía, enteritis e infecciones de extremidades (Sawant, *et al* 2005).

Los antibióticos a niveles subterapéuticos además de ayudar para mejorar el crecimiento y reducir el riesgo de infecciones, también mejoran la digestión y la cantidad de alimento necesario para que los animales lleguen a un peso adecuado

(Crawford y Teske, 1983; Droumev, 1983; Frost, 1991). Casi el 90% de todos los antibióticos utilizados en granjas o ganado son administrados a concentraciones subterapéuticas. El 70% de los antibióticos administrados a concentraciones subterapéuticas son dirigidos para prevenir enfermedades, mientras que el 30% es usado como promotor de crecimiento (CAST, 1981; Hays, 1986; US International Trade Commission, 1987). Se ha observado en estudios que nuevos antibióticos son utilizados de manera común en el ganado (Zwald *et al.*, 2004), además se reporta el uso de antibióticos que son prohibidos para el uso en animales. Por otro lado se han encontrado residuos beta-lactámicos que exceden los niveles permitidos en ganado (Shitandi and Sternesjo, 2004), debido a que el uso de antibióticos deja residuos en los productos de las granjas (Levy *et al.*, 1987; Corpet, 1996; Tenover y McGowan, 1996), los antibióticos pueden entrar a los ecosistemas terrestres y acuáticos a través de los desechos de las granjas (Bates *et al.*, 1994), cuando se aplica a la tierra residuos de medicamentos bioactivos así como bacterias resistentes a antimicrobianos pueden crear reservorios en el medio ambiente, ver Figura 2 (Austin, 1985).

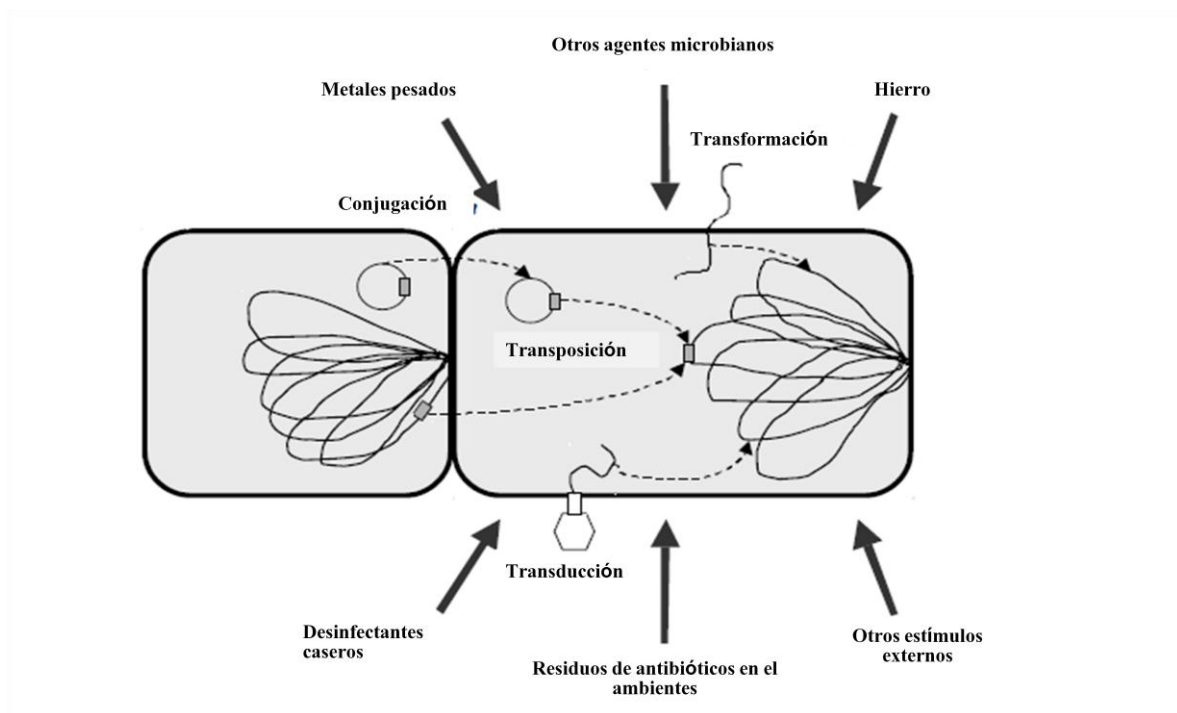


Figura 2. Mecanismos de adquisición de resistencia microbiana. Representa la adquisición, transferencia y estabilidad de la resistencia a los antibióticos.

Otro factor que influye en la resistencia a antibióticos en el ganado es que muchos de los antibióticos aplicados están disponibles sin una prescripción médica (US Food and Drug Administration, 2012), y usualmente la cantidad de antimicrobianos vendidos para animales son 4 veces mayor que la cantidad vendida para humanos (US Food and Drug Administration, 2010, US Food and Drug Administration, 2011), y si bien es poco común que la resistencia aparezca en humanos, el uso indiscriminado de antibióticos en la producción animal sí se ha relacionado con el desarrollo de resistencia microbiana, y en esta área el problema ha emergido como una crisis de salud (World Health Organization, 2012). Este punto clave no ha sido tomado en cuenta con la gravedad que merece, no se ha relacionado del todo el uso de antibióticos en animales con el desarrollo de resistencia de microorganismos patógenos en el hombre, sin embargo sí existe evidencia de que la resistencia en algunos microorganismos patógenos entéricos para humanos han prevalecido gracias a la transferencia de genes provenientes de microorganismos de animales, contaminando la cadena alimenticia (Barton, 2000).

Es de importancia mencionar que las enzimas con mayor incidencia clínica y de creciente dispersión geográfica y en particular de géneros de la familia *Enterobacteriaceae* son las beta-lactamasas, y cabe destacar que existen estudios en donde se describe una alta incidencia de beta-lactamasas en cepas de origen animal (Carattoli *et al.*, 2005, Hopkins *et al.*, 2006, Liebana *et al.*, 2006).

En un estudio reciente de uso de agentes antimicrobianos en ganado lechero se encontró que 24 tipos de antibióticos fueron usados prolongablemente en granjas y ganado como promotores de crecimiento, profilaxis y para tratar enfermedades como neumonía, enteritis e infecciones generales, debido a esto se logró aislar organismos de *Escherichia coli* resistentes a tetraciclina, así mismo se determinó que los genes que le confirieron la resistencia se localizaba en el cromosoma

bacteriano, este estudio indica que el ganado puede ser un importante reservorio para organismos patógenos resistentes y potencialmente pueden contaminar la cadena alimenticia (Sawant *et al.*, 2005).

Adquisición de la resistencia a antibióticos

Los genes de resistencia a microbianos pueden ser diseminados por contacto directo, heces de animales o tierra contaminada, así mismo el suelo puede ser también un reservorio para la diseminación, ya que a pesar de la eficacia de los antibióticos son pobremente absorbidos y aproximadamente del 25 al 75% pueden ser excretados mediante las heces y persistir en el suelo (D'Costa *et al.*, 2006, Chee-Sanford *et al.*, 2001, Hanzawa *et al.*, 1984). La adquisición de la resistencia a antimicrobianos puede ser causada por cambios estructurales en el material genético o ajustes en la maquinaria metabólica, existen dos tipos de transferencia, 1) la transferencia vertical de genes y 2) la transmisión horizontal de genes.

Transferencia vertical

Los genes mutados (producto de mutaciones en genes que codifican para los sitios de reconocimiento de antibióticos, vías metabólicas alternas, bombas de flujo/eflujo o sistemas de degradación) así como la transferencia de genes durante la proliferación se lleva a cabo mediante la transferencia vertical. Las mutaciones pueden ser causadas por errores en la síntesis del DNA, cambios químicos inducidos por mutagenes o una errónea reparación de la cadena de nucleótidos. La frecuencia de las mutaciones son variadas independientes de la presencia de los antibióticos (Davies, 1994), sin embargo investigaciones confirman que una constante exposición a antibióticos puede incrementar significativamente la tasa de mutación y por lo tanto heredar la resistencia a multidroga (Kohanski *et al.* 2010). Además se ha encontrado que el uso de concentraciones subterapéuticas de antibióticos incrementa la concentración mínima inhibitoria (Kohanski *et al.* 2010).

Transferencia horizontal

La transferencia horizontal media la transmisión de genes para la resistencia hacia bacterias susceptibles, los elementos más usados probablemente son los elementos genéticos móviles como los plásmidos, transposones e integrones, esta transferencia puede ser conducida por la conjugación, transformación (captación de DNA libre) y transducción (Syvanen, 1985). Los plásmidos pueden contener rasgos genéticos benéficos para la célula, como utilidades metabólicas adicionales que pueden ser fácilmente transmitidas a otras bacterias mediante la conjugación (Lipps, 2008) por lo tanto los plásmidos son un importante medio de diseminación de los genes responsables de la resistencia a antibióticos.

Un transposones es un tipo de DNA móvil que puede cortarse, copiarse y pegarse utilizando una enzima transposasa, una vez separados de su origen pueden integrarse a un sitio al azar en sitios en el DNA plasmídico (McClintok, 1950), un integron es también un elemento móvil de DNA con un sistema de recombinación específico que es capaz de reconocer y capturar cassetes móviles de genes (Hall y Collis, 1995). Los integrones de resistencia son un importante elemento para la diseminación de genes para la resistencia a través de la cadena alimenticia. A parte de la conjugación las bacterias pueden agregar fragmentos de DNA libres adquiriendo la resistencia, la célula bacteriana puede estos fragmentos e integrarlos dentro de su genoma, esta célula se llama “competente” y al proceso se le llama “transformación”, aunque la transformación es comúnmente baja las altas concentraciones de DNA hacen que la transformación bacteriana sea un método importante para la integración de elementos para la resistencia. (Hall, 1995).

Plásmidos: Reservorios de la resistencia microbiana.

¿Qué son los plásmidos?

Los plásmidos son moléculas de material genético (DNA) extracromosómico que se encuentra circular o lineal y con replicación independiente al DNA cromosómico, presentes en organismos procariotas y en unos cuantos eucariotas, el tamaño de estas moléculas puede variar desde 1 Kilobase (Kb) hasta algunos cientos, entretanto el número de plásmidos presentes en una célula puede variar desde una sola copia hasta decenas por célula. Los plásmidos tienen capacidad de autorreplicarse y mantenerse dentro de la célula, y es gracias a sus elementos genéticos que están involucrados en la replicación plasmídica, estos elementos se agrupan en una unidad genética llamada *replicón*, el replicón contiene una región de entre 2 a 3 Kb que contiene los genes que codifican para las proteínas de control de inicio de la replicación (proteínas *cop* e *inc*), así como las proteínas responsables del inicio de la replicación (*rep*) y otros elementos de control como el RNA antisentido y secuencias específicas de unión de las proteínas que intervienen en el inicio de la replicación (Couturier *et al.*, 1998). Los plásmidos pueden contener otros genes, como por ejemplo los de resistencia a antibióticos y a los metales pesados, los de degradación de compuestos recalcitrantes o los de utilización de otras fuentes de carbono y energía, estos genes le dan a la célula ventajas selectiva y les permiten colonizar nuevos nichos ecológicos (Gstalter *et al.*, 2003). Por lo tanto los plásmidos protegen a la bacteria de efectos tóxicos como son los metales pesados, radicales libres y antibióticos, así mismo los plásmidos pueden contener secuencias que codifican para la síntesis de moléculas enzimáticas como las colicinas, una bacteriocina producida por algunas cepas de *E. coli* (Summers 1996).

Los plásmidos son considerados vectores de la movilización genética mediante la transformación, transducción y conjugación (siendo esta última la más usual) en poblaciones incluso de diferentes especies, siendo capaces de transmitirlo de bacteria a levadura (Summers 1996; Couturier *et al.* 1998).

Esta movilización de la información genética tiene efectos importantes en la evolución bacteriana. Es crucial que un plásmido persista dentro de su huésped, donde el mecanismo de replicación, la herencia y la difusión son esenciales para el mantenimiento. La replicación autónoma es una característica importante para el mantenimiento del plásmido dentro de su hospedero podría ser potencialmente regulada a nivel de iniciación, elongación o terminación (Couturier *et al.*, 1998). Para que un plásmido pueda replicarse requiere de una secuencia dentro del mismo llamada “*replicón*”, ésta es una región de 1-3 kbs, algunos plásmidos pequeños contienen solo un replicón sin embargo plásmidos que son grandes pueden contener varias secuencias que por las cuales se puede iniciar su replicación (Couturier *et al.* 1998). Plásmidos con múltiples replicones incrementa su diseminación y su persistencia en los hospederos, incluyendo la interacción y el control de la incompatibilidad con algún plásmido residente (Couturier *et al.* 1998).

Incompatibilidad plasmídica

La incompatibilidad plasmídica se define como el proceso por el cual un plásmidos inhibe el mantenimiento estable de un segundo plásmido en una célula, a esto se le considera que ambos plásmidos son incompatibles (Couturier *et al.*, 1998), la incompatibilidad de plásmidos fue descrita a principios de la década de los 60 en el plásmido F (Maas y Maas, 1962, Scaife y Gross, 1962) al observarse que en bacterias transcojugantes portadoras del plásmido F integrado en su cromosoma no se replicaba con otro plásmido F autónomo (Dubnau y Maas, 1968), basándose en esta característica los plásmidos se agruparon en diferentes grupos de acuerdo a su incompatibilidad, Datta y Hedges generaron un esquema basado es este criterio a principios de la década de los 70 (Datta y Hedges, 1972), en la actualidad existen más de 30 grupos de incompatibilidad en la familia *Enterobacteriaceae* y más de 14 en el género de *Pseudomonas* (Couturier *et al.*, 1998).

Plásmidos como marcadores

Métodos moleculares como herramienta

Los organismos resistentes a antibióticos tienen una amplia variedad de patrones de sensibilidad y la aplicación de estos mismos debe estar guiada (Gross, 1998). El desarrollo de la resistencia a antibiótico en *E. coli* tiene implicaciones clínicas importantes, por ejemplo, el desarrollo de resistencia a viejos antibióticos como la penicilina y la trimetoprima-sulfatetoxazol así como el problema emergente de la resistencia a fluoroquinolonas, puede limitar seriamente las opciones de que antibiótico usar (Karlowsky *et al.*, 2002). Desde los reportes de transferencia de la resistencia a antimicrobianos la importancia de los plásmidos ha aumentado progresivamente, el entendimiento de como participan los plásmidos en las infecciones se expande mas allá que el de la resistencia a las drogas, gracias a caracterizaciones clínicas de cómo los plásmidos intervienen en las infecciones, esto incluye los mecanismos de virulencia y la habilidad de colonizar, resistencia a las defensas del hospedero y producción de toxinas (Platt *et al.*, 1984). Sin embargo, la modificación de características bioquímicas de los plásmidos usadas en la identificación de patógenos puede resultar en un erróneo reconocimiento y tratamiento de infecciones (Smith y Parsell, 1975).

En la actualidad para determinar perfiles fenotípicos y susceptibilidad microbiana se utilizan métodos convencionales, y aunque estos métodos son útiles para detectar los perfiles de resistencia, seleccionar los fármacos adecuados y trazar la dispersión de cepas individuales dentro de hospitales o regiones no es suficiente para los nuevos retos que conllevan la aparición de la resistencia a antibióticos, es por esto que los métodos moleculares proveen herramientas eficaces para dar un seguimiento adecuado a la dispersión de cepas bacterianas patógenas y contribuir a la evaluación de de brotes infecciosos, infecciones recurrentes y diseminación de clones específicos patógenos (Sader *et al.*, 1995), los métodos moleculares también son usados para generar información adicional como la detección y evaluación de de la diseminación de patógenos multi-resistentes (Pfaller *et al.*, 2001).

La caracterización molecular de microorganismos es frecuentemente usada por médicos, microbiólogos y epidemiólogos para proveer evidencia de la relación genética como ayuda en la investigación epidemiológica de las enfermedades infecciosas (Sader *et al.*, 1995). La necesidad de determinar la relación entre organismos puede surgir durante una investigación de brote en el que un grupo de infecciones causadas por organismos de la misma especie muestran perfiles similares de resistencia antimicrobiana, esto con el fin de determinar la propagación clonal dentro de un microambiente, así como la fuente de infección (Sader *et al.*, 1995). La aplicación de análisis moleculares, tal como un análisis de proteínas de células enteras o un análisis de plásmidos, ayuda a las investigaciones de los brotes de enfermedades infecciosas y el resultado ha sido proporcionar muchos marcadores útiles que distinguen el clon epidémico de un patógeno particular y a ayudado a la identificación de vehículos específicos de infección (Waschmut *et al.*, 1991).

El análisis de plásmidos proveen un método muy útil para diferenciar aislados bacterianos, por ejemplo, 96 aislados entéricos fueron aislados de rebaños y fueron examinados mediante la extracción de DNA, digestión mediante enzimas de restricción y geles de electroforesis, este último para analizar los perfiles de tamaños de los plásmidos, de esta manera pudieron concluir la movilización de los plásmidos y de polimorfismos de longitud de fragmentos a través de los rebaños y del tiempo (Dorn *et al.*, 1992). Por lo tanto el número y tamaño de los plásmidos presentes es usado como base para la identificación de las cepas, la caracterización por estos medios han sido usados de manera exitosa para el análisis de brotes de infecciones nosocomiales e infecciones comunitarias adquiridas causadas por una amplia variedad de especies gran-negativas (Schaberg *et al.*, 1981, Fornasini *et al.*, 1992)

Los métodos convencionales que incluyen morfología y pruebas físicas son usados para la identificación y caracterización de cepas bacterianas (Fantasia, 1990), sin embargo estos métodos pueden ser in por factores fisiológicos, sin embargo las técnicas moleculares son más sensibles, rápidas y fáciles de aplicar

que los métodos convencionales de diagnóstico (Relman *et al.*, 1992; Relman, 1999). Celebi y colaboradores, muestran que analizar la susceptibilidad de antibióticos, extracción de DNA y un análisis de proteínas (SDS-PAGE) yudan eficazmente a distinguir cepas de *E. coli*, también encontraron que no hay una estrecha relación entre la ocurrencia de los plásmidos y la múltiple resistencia a antibióticos, ya que en ocasiones la resistencia no se encontraba en el plásmido (Celebi *et al.*, 2007).

JUSTIFICACIÓN

El surgimiento de la resistencia a antibióticos por parte de las bacterias es un problema a nivel mundial, se ha observado que en diferentes continentes la resistencia puede comprometer a pacientes hospitalizados así como procesos terapéuticos delicados como lo es una quimioterapia. Los organismos más comunes que se han identificado con esta habilidad de resistir a los antibióticos de amplio espectro y además de importancia clínica son *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp. entre otros. Estos organismos han mostrado un aumento en su capacidad de resistencia en los últimos años (Ronald y Michael, 1998), es por esto que es de gran importancia aplicar nuevos métodos para identificar estas especies al momento que surgen en las poblaciones. Si bien podemos encontrar estudios de estos organismos muchos de ellos no corresponden específicamente a México, por lo tanto el estudio del surgimiento de microorganismos multi-resistentes es escaso, y si nos referimos al lugar donde se llevó a cabo este trabajo, Querétaro, reducimos aún más la cantidad de trabajos referentes a este tema, es por estos motivos que la caracterización de cepas obtenidas de ganado enfermo con signos de diarrea es de vital importancia para prevenir el descontrol de microorganismos resistentes, además es un punto clave para comenzar a evitar la diseminación de estas bacterias multi-resistentes hacia el hombre.

HIPÓTESIS

Dado que los plásmidos contienen información genética de importancia ecológica para las bacterias, su caracterización y secuenciación nos ayudará a identificar en dónde se encuentran y cuáles son algunas de esas ventajas que el material genético les confiere a las bacterias de *E. coli* aisladas de ganado enfermo.

OBJETIVOS

General.

- Caracterizar genética y bioquímicamente los aislados de la familia *Enterobacteriaceae*.

Particulares.

1. Determinar el perfil de resistencia a antibióticos de los aislados involucrados.
2. Identificar los aislados por tres métodos, Biolog, MALDI-TOF (espectrometría de masas) y 16S rRNA.
3. Determinar el perfil de plásmidos de los aislados y obtener la secuencia de al menos uno de los plásmidos.

METODOLOGÍA

Aislamiento de las cepas y extracción de plásmidos.

Se obtuvieron diez aislados de muestras fecales de vacas con signos de diarrea, estos aislados se crecieron en agar MacConkey, se rotularon con las siglas CM1 a CM10 para identificarlas en el laboratorio, obtenidas en agar se sembraron en medio LB con 10% de glicerol para almacenarlos posteriormente a -70°C. El método utilizado para la obtención del material genético plasmídico fue el de Birnboim modificado (Birnboim and Doly, 1979), se inoculó la cepa en 10 ml de medio Luria Bertani (LB) con Carbenicilina (100 µl/ml) y se incubó a 37°C en

agitación constante durante 18 horas, se agregaron 2 ml del cultivo a un tubo eppendorf (2 ml) y se centrifugó 1 minuto a 12,000 rpm, se eliminó el sobrenadante decantando y dejando la pastilla lo más seca posible, se resuspendió con 150 µl de Solución I (ANEXO 1) y se agitó en vortex para disolver la pastilla, en seguida se adicionaron 300 µl de Solución II y se mezcló gentilmente inclinando el tubo cinco veces dejándolo 5 minutos a temperatura ambiente, pasado el tiempo se agregaron 200 µl de Cloroformo y se mezcló gentilmente dejándolo actuar por 1 minuto, posteriormente se añadieron 200 µl de Solución III y se mezcló por inversión dejándolo en hielo por 30 minutos. Completado el tiempo se centrifugó por 21 minutos a 14,000 rpm a temperatura ambiente, la fase acuosa (la fase de arriba en el tubo) se recuperó y se transfirió a un tubo nuevo eppendorf de 1.5 ml, a este nuevo tubo se le adicionó 1 Volumen de Isopropanol y se mezcló gentilmente para después centrifugarlo por 21 minutos a 14,000 rpm a temperatura ambiente, posteriormente se eliminó el sobrenadante y se quedó solo con la pastilla, se le añadió 1 ml de etanol al 70% para lavar la pastilla y se centrifugó por 10 minutos a 14,000 rpm, hecho esto se eliminó el Etanol y se secó la pastilla en el thermoblock a 65°C por 10 minutos, se resuspendió en 35 µl de agua destilada estéril con RNAasa (20 mg/ml), se tomaron 2 µl para correrlos en un gel de agarosa (ANEXO 2) al 0.8% y se observaron los resultados.

Preparación para la secuenciación.

Limpieza por Fenol-Cloroformo

Siguiendo el procedimiento de la extracción de plásmidos y después de que se agregó la RNAasa (20mg/ml) se incubó a 37°C por 30 min y se añadió 1 volumen de Fenol-Cloroformo (en proporción 200 µl/200 µl) y se agitó en vortex por 10 segundos y se agregaron 200 µl de Solución III, se centrifugó por 5 minutos a 12,000 rpm y se recupero el sobrenadante, se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto y se centrifugó por 10 minutos a 14,000 rpm, hecho esto se eliminó el Etanol y se secó la pastilla en Thermoblock a 65°C por 10 minutos, se empaquetó,

se etiquetó y se mandó a MACROGEN en Corea para su secuenciación mediante la plataforma de secuenciación IlluminaHiSeq 2000 (MACROGEN, Seoul, Korea). Las secuencias obtenidas en Fastq se ensamblaron con SPAdes v3.1.1.

Construcción de la Genoteca

Extracción y purificación del plásmido

Se extrajo el DNA por el método de BirnBoim (ANEXO 1) y se corrieron 25 µl de la extracción y 5 µl de colorante GelRed en un gel de agarosa al 0.5 % a 60 V durante 60 minutos. Obtenido el gel, se observó en el transluminador (Luz Ultravioleta) y se comprobó la presencia del material genético plasmídico, una vez obtenidas las bandas se cortaron directamente del gel con ayuda de un bisturí esterilizado y se colocaron en un tubo de 1.5 ml procurando que el bloque de agarosa no fuera en exceso grande.

Se utilizó el kit de QIAGEN DNA Cleaner (QIAGEN, Hilden, Alemania) para recuperar el DNA plasmídico. En tubo de 1.5 ml con el bloque de agarosa se le agregaron 2 volúmenes del Buffer de unión (Binding buffer) y se agitó en vortex hasta que desapareció por completo el bloque de agarosa, se pasó la mezcla a una columna (tubo Zymop tip, 5 µl) y la columna se colocó arriba de un tubo recuperador, se centrifugó a 10,000 rpm por 30 segundos, se desechó el sobrenadante y se agregó nuevamente a la columna 200 µl de agua de lavado (Washing buffer) y se centrifugó a 10,000 rpm por 30 segundos, éste último paso se repitió una vez más y se añadió 30 µl de agua DEPC y se centrifugó colocando esta vez la columna en un tubo de 1.5 ml nuevo y estéril a 10,000 rpm durante 30 segundos.

Se tomaron 2 µl del resultado de la limpieza y se corrieron en un gel de Agarosa al 0,8 % a 75 V durante 45 minutos para comprobar que el DNA plasmídico estaba presente después de la limpieza.

Digestión del material plasmídico

El plásmido se digirió con la enzima *HincII* (*HindII*) de la marca Thermo Scientific, se agregó 16 µl de agua libre de nucleasas, 2 µl del Buffer Tango 10X, 1 µl del DNA plasmídico y 1 µl de la enzima *HincII*, se mezcló gentilmente con la micropipeta y se incubó a 37°C por 30 minutos. Terminada la digestión se corrió un gel de agarosa al 0.8 % para corroborar que el plásmido se haya cortado y se guardó la imagen para su posterior análisis.

Clonación

Una vez que se obtuvieron los fragmentos del plásmido se clonaron en el vector pJET con ayuda del kit CloneJET PCR Cloning (ThermoFisher, Massachusetts, USA), en un tubo eppendorf de 1.5 ml se colocaron 10 µl de Buffer de reacción 2X, 1 µl de la digestión que se hizo con *HincII*, 1 µl de agua libre de nucleasas y 6 µl de enzima DNA embotadora, se vortexeó gentilmente y se incubó la mezcla a 70°C por 5 minutos, a continuación se agregó 1 µl del vector para clonación pJET1.2/blunt y 1 µl de T4 DNA Ligasa, se mezcló gentilmente y se incubó a 22°C por 5 minutos, finalmente el tubo se colocó en hielo para seguir con la transformación.

Transformación

Previamente se prepararon las células competentes (XL1-Blue) (ver ANEXO 2) para llevar a cabo la transformación con la clonación de los fragmentos del plásmido, el proceso se hizo por triplicado, a cada tubo con las células competentes se les agregó 5 µl de la clonación y se mantuvieron en hielo durante 30 minutos para después someterlas a un choque térmico a 37°C por tres minutos, se dejaron enfriar a temperatura ambiente para posteriormente añadir 100 µl a una placa de cultivo con medio LB y con carbenicilina (100 µg/ml), las cajas se incubaron por 24 horas a 37°C y se observó el crecimiento bacteriano.

Obtenidas las colonias, se aislaron en medio líquido LB, se picó la colonia y se sembró en 2.5 ml, una vez aisladas todas las colonias se incubaron a 37°C por 24 horas, al siguiente día se realizó la extracción de cada aislado y el resultado se observó en un gel de agarosa al 0.8%. La extracción de las colonias que se observaron de buena calidad se almacenaron con glicerol 10% en el ultracongelador a -70°C.

BIOLOG: Gen II MicroPlate

La identificación por medio de fuentes de carbono se llevó a cabo con ayuda del Kit de BIOLOG Gen II Microplate (BIOLOG, Hayward, USA) (Tang, *et al.* 1998).

Las diez cepas se sembraron por estriado y por separado cada una en una caga con el medio agar de BIOLOG BUG+B (ANEXO 3), y se incubaron a 37°C por 24 horas, posteriormente se recuperó un paquete celular con un asa estéril tratando de no arrastrar nutrientes del agar y se inoculó en el Fluido de Inoculación GN/PG de BIOLOG hasta llegar a una densidad entre 0.5 y 0.52 a 590 nm (Holmes., *et al.*, 1994; Tang., *et al.*, 1998), como blanco se usó el mismo Fluido de Inoculación.

Se agregaron 150 µl del inóculo a cada pozo de las placas GEN II Microplate procurando hacerlo antes de diez minutos después de su preparación, con excepción del pozo A1, en donde se colocó Fluido de Inoculación, a continuación se incubaron a 37°C con agitación por 4 horas, a este tiempo se hizo la primera lectura con el lector de MicroPlacas de BIOLOG (Hayward, USA) (Tang, *et al.* 1998)., terminada la lectura se regresaron a 37°C nuevamente y se realizó otra lectura a las 24 horas después de haber sido inoculadas. Al momento que se hicieron las lecturas el software MicroLog hizo la comparación automáticamente contra su base de datos MicroLog GN (3.01A) (Hayward, USA) (Tang, *et al.* 1998)., los resultados se almacenaron en una memoria USB para su posterior análisis.

MALDI-TOF Espectrometría de masas

Este método utiliza la bacteria extraída directamente de colonia, MALDI-TOF se llevó a cabo con ayuda del espectrómetro de masas MicroFlex LT de acuerdo con el protocolo establecido por el fabricante. La medición del espectro fue analizado utilizando el SoftWare Bruker Biotyper 2.0 y la biblioteca (versión 2.0, 3740 entradas, BrukerDaltonics) (Etienne, *et al.* 2010) (ACCUGENIX, Newark, USA). Los criterios de identificación utilizados fueron los recomendados por el fabricante, una puntuación de ≥ 2.000 identificación a nivel de especie, una puntuación de 1.700 a 1.999 identificación indicado a nivel de género, y una puntuación de < 1.700 fue interpretado como ninguna coincidencia.

Prueba de resistencia a antibióticos.

Las 10 cepas se sembraron en tubos falcón con 10 ml de medio líquido LB y se incubaron a 37°C con agitación por 24 horas, posteriormente los tubos se colocaron en hielo.

Los antibióticos y sus concentraciones utilizadas para las pruebas de resistencia se muestran en la Tabla 2, las concentraciones se obtuvieron de acuerdo al criterio de la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008).

Tabla 2. Fármacos y concentración. Antibióticos aplicados en la prueba de resistencia. Muestra el nombre del antibiótico, abreviaturas de referencia y la concentración que se aplicó durante la prueba.

| Antibiótico | Abreviación | Concentración |
|-----------------|-------------|---------------|
| Carbenicilina | CB | 100µg/ml |
| Kanamicina | KAN | 30µg/ml |
| Cloramfenicol | CL | 30µg/ml |
| Estreptomicina | SPT | 50µg/ml |
| Polimixina | PB | 2µg/ml |
| Espectinomicina | RIF | 100µg/ml |
| Rifampicina | STR | 10µg/ml |

A partir de la concentración que reporta la literatura como inhibitoria se escalaron 5 concentraciones, 0, 1, 2, 3, 4 y 5 (ejemplo, CB, 0 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 60 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml), el cero indica que no está presente el antibiótico). Los antibióticos se prepararon de la siguiente manera: a partir de una solución con antibiótico y concentración inicial conocida, se hicieron los cálculos para preparar 2 ml de solución final ($C_1V_1 = C_2V_2$) en medio líquido LB al 50% para cubrir las 10 cepas.

Se utilizaron microplacas de 96 pozos estériles, se llevó a cabo por triplicado, en cada pozo se colocó 250 µg de medio líquido LB con el antibiótico y 10 µg del preinóculo, la organización de las cepas y los antibióticos se muestra en la Figura 3.

Una vez inoculadas las cajas se incubaron a 37°C por 24 horas y con agitación constante. Posteriormente se midió la absorbancia de las placas en el lector de MicroPlacas ELISA, los datos obtenidos se guardaron de forma permanente en un dispositivo USB para su posterior análisis.

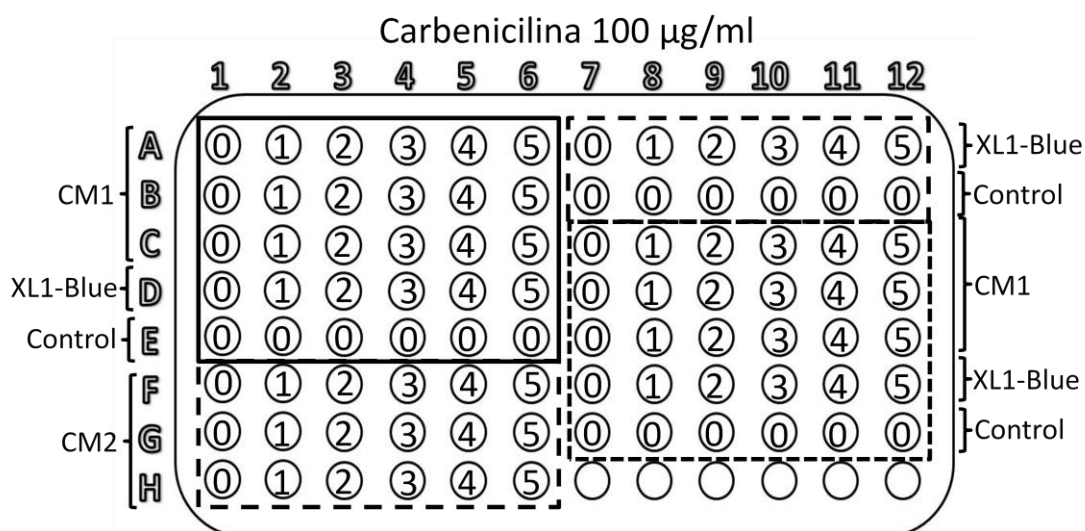


Figura 3. Acomodo de las cepas y antibióticos en la microplaca. Muestra el acomodo de las cepas y sus controles en la MicroPlaca de 96 pozos. El 0 indica que no hay concentración de antibiótico, del 1 al 5 son las concentraciones del antibiótico, CB = 0 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 60

µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml. Muestra el control XL1-Blue al cual se le aplicaron las mismas concentraciones que a la cepa experimental. El Control no contiene antibiótico ni inóculo.

RESULTADOS

Identificación

El resultado de la identificación para cada cepa por medio del kit de biología, Biotype y 16S se muestra en la Tabla 3. De acuerdo a la información obtenida de la identificación por medio del Kit de Biología, MALDI-TOF y el análisis por 16S las diez cepas fueron identificadas como *Escherichia coli*.

Tabla 3. Identificación de los aislados. Muestra el resultado de la Identificación de las cepas utilizando el sistema de identificación Biología, MALDI-TOF espectrofotografía de masas y el

| Identificación de las cepas CM1 – CM10. | | | | | | |
|---|-------------------------------------|------|-------------------------|-------|-------------------------|-----|
| Cepa | Biología | | Biotype | | 16S | |
| CM1 | <i>Salmonella typhimurium</i> | 0,49 | <i>Escherichia coli</i> | 2.267 | <i>Escherichia coli</i> | 946 |
| CM2 | <i>Escherichia coli (USP5-7085)</i> | 0,3 | <i>Escherichia coli</i> | 2.531 | <i>Escherichia coli</i> | 946 |
| CM3 | <i>Salmonella typhimurium</i> | 0,6 | <i>Escherichia coli</i> | 2.481 | <i>Escherichia coli</i> | 939 |
| CM4 | <i>Citrobacter Freundii</i> | 0,5 | <i>Escherichia coli</i> | 2.458 | <i>Escherichia coli</i> | 939 |
| CM5 | <i>Citrobacter Freundii</i> | 0,5 | <i>Escherichia coli</i> | 2.422 | <i>Escherichia coli</i> | 939 |
| CM6 | <i>Citrobacter Freundii</i> | 0,41 | <i>Escherichia coli</i> | 2.438 | <i>Escherichia coli</i> | 939 |
| CM7 | <i>Escherichia coli (USP5-7085)</i> | 0,4 | <i>Escherichia coli</i> | 2.576 | <i>Escherichia coli</i> | 946 |
| CM8 | <i>Salmonella typhimurium</i> | 0,7 | <i>Escherichia coli</i> | 2.487 | <i>Escherichia coli</i> | 939 |
| CM9 | <i>Escherichia coli (USP5-7085)</i> | 0,4 | <i>Escherichia coli</i> | 2.479 | <i>Escherichia coli</i> | 946 |
| CM10 | <i>Escherichia coli (USP5-7085)</i> | 0,3 | <i>Escherichia coli</i> | 2.403 | <i>Escherichia coli</i> | 946 |

análisis de 16S rDNA.

Perfiles plasmídicos.

Los resultados obtenidos de la extracción del material genético plasmídico de las diez cepas con las que se trabajó se muestran en la Figura 4, se observa que la cepa CM1 cuenta con bandas de 10 Kpb, 5 k Kpb y otras que van de 2 a 3 Kpb

más el material cromosómico que se encuentra en la parte superior. La cepa CM2 a parte del material cromosómico muestra una sola banda de aproximadamente 4 Kpb. Las cepas CM3, CM5 y CM6 muestran un patrón de bandeo similar por lo que podríamos decir que es la misma cepa, de igual manera muestran el material cromosómico situado hasta arriba, también muestran bandas de entre 6 y 8 Kpb, una banda más intensa de aproximadamente 5 Kpb seguida de una más pequeña de 2 a 3 Kpb, hasta abajo se puede observar otra de menos de 2 Kpb, todas se muestran de igual manera en las tres cepas antes mencionadas. La cepa CM4, tres bandas que están en un peso entre 5 y 8 Kpb, y comparte la más pequeña de menos de 2 Kpb igual que con las cepas CM3, CM5 y CM6. CM7 muestra bandas de entre 5 y 6 Kpb y una más pequeña de poco menos de 2 Kpb. Para CM8 se reporta una banda de más de 10 Kpb, la cual no se observó en ninguna otra cepa, pero además se observó una banda de 2 Kpb. En CM9 se observó una banda de poco menos de 5 Kpb y una más pequeña de 2 Kpb, similar con las que cuentan de la CM3 a la CM6. Y en CM10 solo se observó una banda de poco menos de 5 Kpb.

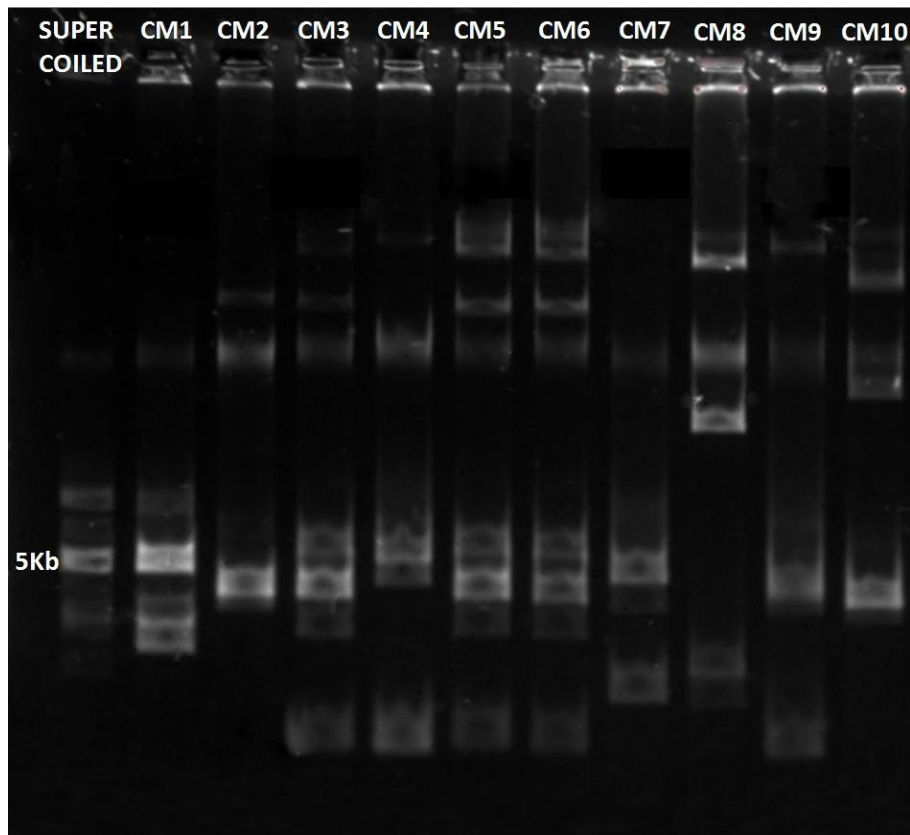


Figura 4. Patrones plasmídicos. Perfiles plasmídicos corridos en un gel de agarosa al 0.8% por electroforesis. En el primer carril se observa la escalera Supercoiled DNA ladder que representa un tamaño máximo de 10 Kpb y un mínimo de 2 Kpb. Del carril 2 al 11 se observan las diez cepas que van de CM1 a CM10.

Ensamblaje y análisis de secuencias.

Genoteca.

Una vez que se purificaron los plásmidos de las cepas experimentales, se digirieron con la enzima *HincII*, los fragmentos resultantes se insertaron en el plásmido pJet, a continuación se hizo la transformación de este plásmido más el fragmento en la cepa de laboratorio *E. coli* XL1-Blue, las células transformantes se incubaron a 37°C para consecutivamente realizar la extracción plasmídica. Los resultados de las colonias con los insertos se muestran en las Figuras 5, 6 y 7.

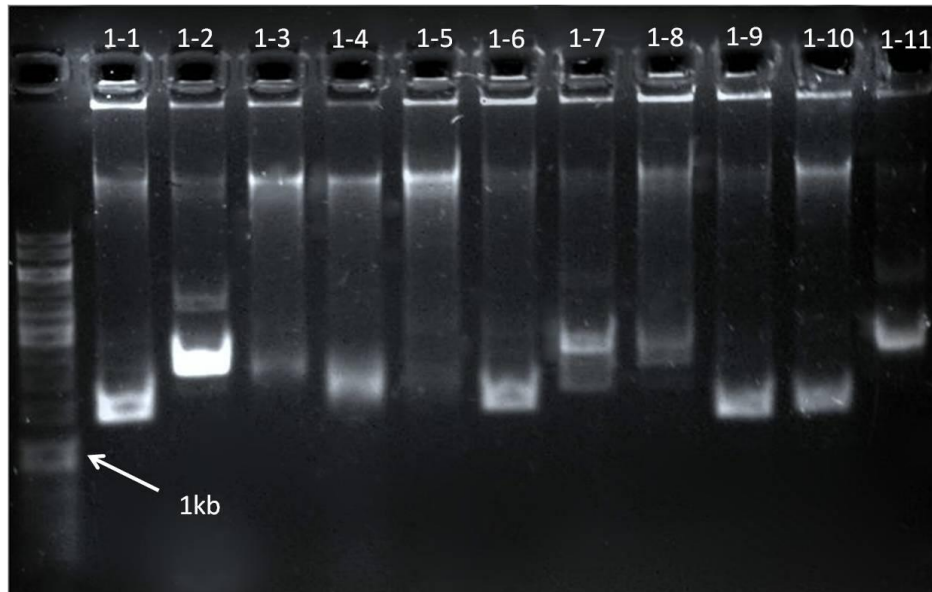


Figura 5. Genoteca. En el carril número uno se muestra la escalera de 1kb, en los carriles siguientes las clonas obtenidas, de la cepa CM1 (1-1, 1-11).

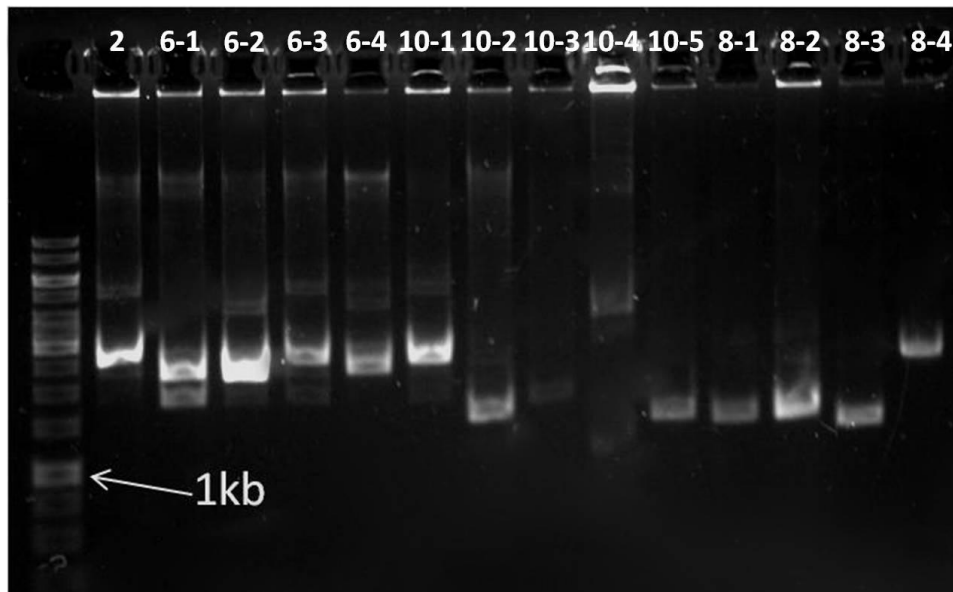


Figura 6. Genoteca. En el carril número uno se muestra la escalera de 1kb, en los carriles siguientes las clonas obtenidas, de la cepa CM2 (2), CM6 (6-1, 6-4), CM10 (10-1, 10-5), CM8 (8-1, 8-4).

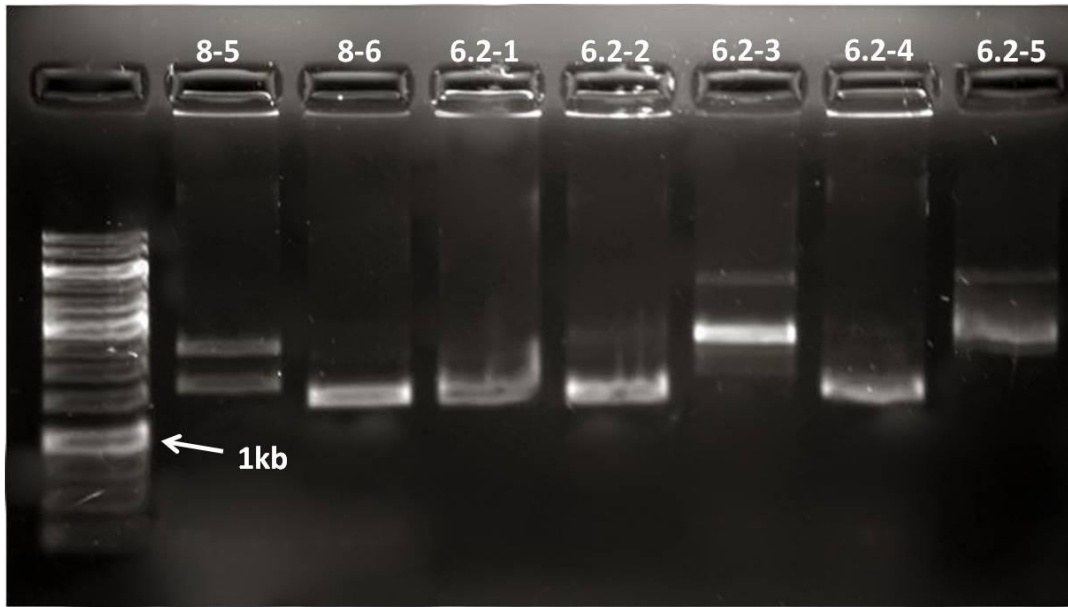


Figura 7. Genoteca. En el carril número uno se muestra la escalera de 1kb, en los carriles siguientes las clonas obtenidas, de la cepa CM8 (8-5, 8-6), CM6 (6.2-1, 6.2-5).

Fuentes de Carbono: Kit Biolog

El Kit de Biolog está diseñado para la identificación así como para la caracterización de una gran gama de microorganismos Gram-negativos, la microplaca contiene 95 diferentes fuentes de carbono que al reaccionar con la cepa se forma un patrón de reacción al que llaman, *huella digital metabólica*, este patrón es analizado por la base de datos de MicroLog para referirnos a una especie bacteriana. Para analizar la *huella digital metabólica* en este trabajo se han clasificado las 95 fuentes de carbono de acuerdo a su naturaleza química como se puede ver en la tabla 4, así mismo en la tabla 5 se observan las diez cepas analizadas con su distribución en la microplaca, además nos muestra si la cepa utiliza o no la fuente de carbono.

Tabla 4. Fuentes de carbono que componen el Kit Biolog. Muestra la clasificación de las 95 fuentes de carbono que componen el kit de Biolog GEN II para gram-negativas y su clasificación de acuerdo a su naturaleza química.

| Clasificación | Fuente de Carbono (Biolog) | | | | |
|------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| | Carbohidratos | α -Ciclodextrina | Dextrina | Glucógeno | Tween 40 |
| L-Arabinosa | | D- celobiosa | D- fructosa | L-Fucosa | D-galactosa |
| Gentiobiosa | | α - D - glucosa | α -D-Lactosa | Lactulosa | Maltose |
| D-Manosa | | D-Melibiosa | β -metil - D - glucósido | D- Psicose | D- rafinosa |
| L- ramnosa | | Sacarosa | D- trehalosa | D-Turanosa | D- ácido galacturónico |
| D-Ácido sacárico | | Glucosa-1-fosfato | Glucosa-6-fosfato | | |
| Amino-azucres | N -acetil- D- galactosamina | N - acetil - D - glucosamina | | | |
| Poli-Alcohol | Adonitol | D-Arabitol | i_Erythritol | m-Inositol | D - Manitol |
| | D-Sorbitol | xilitol | | | |
| Ácido | metil piruvato | Mono -metil- Succinato | ácido Acético | Cis- ácido aconítico | ácido Cítrico |
| | Ácido urocánico | | | | |
| | ácido fórmico | D- lactona de ácido galactónico | D-Ácido Glucónico | D-acido glucosamínico | D- Ácido glucurónico |
| | α -hidroxi ácido butírico | β -hidroxi ácido butírico | γ -hidroxi ácido butírico | ácido p hidroxifenilacético | α - Acido Cetobutírico |
| | α -Acido cetoglutarico | α -Acido cetovalerico | D , L - ácido láctico | Ácido malónico | Ácido propanoico |
| | Ácido quínico | Ácido sebácico | Ácido succínico | Ácido succinamico | |
| Aminoácido | L-Alaninamida | D-Alanina | L-Alaninamida | L- Alanilglicina | L- Asparagina |
| | L- Ácido Aspártico | L-Ácido glutámico | Glicil-L- Aspártico | Glicil-L-glutámico | L-Histidina |
| | Hidroxiprolina | L-Leucina | L-Ornitina | L-Fenilalanina | L-Prolina |
| | Ácido L- Piroglutámico | D-Serina | L-Serina | L-Treonina | D,L-Carnitina |
| | Ácido γ - aminobutírico | | | | |
| Nucleósido | Inosina | Uridina | Timidina | | |
| Amina | Feniletilamina | Putrecina | Etanolamina | | |
| Alcohol | 2,3- Butamodiol | Glicerol | D,L- α -Glicerol fosfato | | |

Tabla 5. Fuentes de carbono utilizadas por los aislados. Muestra en la primera columna las coordenadas de los pozos en las microplacas (96 pozos), en la segunda columna se encuentran en primer lugar el control (agua), posteriormente las 95 fuentes de carbono, en las siguientes columnas se encuentran las cepas de la CM1 a CM10. El signo “+” indica que la cepa crece en presencia de la fuente de carbono.

| | | CM1 | CM2 | CM3 | CM4 | CM5 | CM6 | CM7 | CM8 | CM9 | CM10 |
|------------|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| | Fuente de Carbono | | | | | | | | | | |
| A1 | AGUA | | | | | | | | | | |
| A2 | α -Cyclodextrin | + | | | + | | | | + | | |
| A3 | Dextrin | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| A4 | Glycogen | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| A5 | Tween 40 | + | + | + | | + | | + | + | | |
| A6 | Tween 80 | + | + | | | | + | | + | | |
| A7 | N-Acetyl-D-galactosamine | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| A8 | N-Acetil-D-glucosamina | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| A9 | Adonitol | + | | + | + | | | | + | | |
| A10 | L-Arabinosa | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| A11 | D-Arabitol | + | | + | + | + | | | + | | |
| A12 | D-Cellobiose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| B1 | i_Erythritol | + | | + | + | | | | + | | |
| B2 | D-Fructose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| B3 | L-Fucose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| B4 | D-Galactose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| B5 | Gentiobiose | + | | + | + | + | | | + | | |
| B6 | α -D-Glucose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| B7 | m-Inositol | + | | + | + | | | + | + | | |
| B8 | α -D-Lactose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| B9 | Lactulose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| B10 | Maltose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| B11 | D-Mannitol | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| B12 | D-Mannose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| C1 | D-Melibiose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| C2 | β -Methyl-D-Glucoside | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| C3 | D-Psicose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| C4 | D-Raffinose | + | + | + | + | + | + | + | + | | + |
| C5 | L-Rhamnose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| C6 | D-Sorbitol | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| C7 | Sucrose | + | + | + | * | + | * | | + | | + |
| C8 | D-Trehalose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| C9 | Turanose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| C10 | Xylitol | + | | + | + | + | + | | | | |
| C11 | Methyl Pyruvate | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| C12 | Mono-Methyl-Succinate | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| D1 | Acetic Acid | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| D2 | Cis-Aconitic Acid | + | | + | + | + | + | | + | | |

| | | | | | | | | | | | |
|-----|--------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| D3 | Citric Acid | + | | + | + | + | * | | + | | |
| D4 | Formic Acid | + | + | + | + | + | + | + | + | * | + |
| D5 | D-Galactonic Acid Lactone | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| D6 | D-Galacturonic Acid | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| D7 | D-Gluconic Acid | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| D8 | D-Glucosaminic Acid | + | | * | * | + | + | | + | | |
| D9 | D-Glucuronic Acid | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| D10 | α -Hydroxy Butyric Acid | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| D11 | β -Hydroxy Butyric Acid | + | | * | * | | | | | | |
| D12 | γ -Hydroxy Butyric Acid | + | | | | | | | | | |
| E1 | p-Hydroxy Phenylacetic Acid | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| E2 | Itaconic Acid | + | + | + | * | | | | + | | |
| E3 | α -Keto Butyric Acid | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| E4 | α -Keto Glutaric Acid | + | + | + | * | + | + | | + | | |
| E5 | α -Keto Valeric Acid | + | + | + | | * | + | | | | |
| E6 | D,L-Lactic Acid | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| E7 | Malonic Acid | + | | * | * | * | | | + | | |
| E8 | Propionic Acid | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| E9 | Quinic Acid | | | | | | | | | | |
| E10 | D-Saccharic Acid | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| E11 | Sebacic Acid | | | | | | | | | | |
| E12 | Succinic Acid | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| F1 | Bromo Succinic Acid | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| F2 | Succinamic Acid | + | | + | * | | | | + | | |
| F3 | Glucuronamide | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| F4 | L-Alaninamide | + | + | + | + | + | + | | + | + | + |
| F5 | D-Alanine | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| F6 | L-Alanine | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| F7 | L-Alanyl glycine | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| F8 | L-Asparagine | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| F9 | L-Aspartic Acid | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| F10 | L-Glutamic Acid | + | + | + | + | + | + | | + | + | |
| F11 | Glycyl-L-Aspartic | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| F12 | Glycyl-L-Glutamic Acid | + | + | + | + | + | * | + | + | + | + |
| G1 | L-Histidine | | | | | | | | | | |
| G2 | Hydroxy-L-Proline | | | | | | | | + | | |
| G3 | L-Leucine | | | | | | | | | | |
| G4 | L-Ornithine | + | | + | * | * | * | | + | | |
| G5 | L-Phenylalanine | | | | | | | | | | |
| G6 | L-Proline | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| G7 | L-Pyroglutamic Acid | | | | | | | | | | |
| G8 | D-Serine | + | | + | | | * | | + | | |
| G9 | L-Serine | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| G10 | L-Threonine | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| G11 | D,L-Carnitine | | | * | | | | | + | | |
| G12 | γ -Amino Butyric Acid | | | * | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | |
|-----|-----------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| H1 | Urocanic Acid | | | | | | | | | | |
| H2 | Inosine | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| H3 | Uridine | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| H4 | Thymidine | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| H5 | Phenyethylamine | | | | | | | | | | |
| H6 | Putrescine | | | | | | | | + | | |
| H7 | 2-Aminoethanol | + | | | | | | | + | | |
| H8 | 2,3-Butanediol | | | * | * | | | | + | | |
| H9 | Glycerol | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| H10 | D,L- α -Glycerol Phosphate | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| H11 | Glucose-1-Phosphate | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| H12 | Glucose-6-Phosphate | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

Pruebas de resistencia a antibióticos

La resistencia a antibióticos entre cepas de *Escherichia coli* se muestran en la imagen 5. De las diez cepas analizadas nueve fueron resistentes a Carbenicilina, con excepción de la cepa ocho (CM8) que mostró sensibilidad al antibiótico, por otro lado todas las cepas fueron resistentes a Kanamicina y solo la cepa ocho mostró resistencia a Polimixina. En cuanto a la Espectinomomicina solo siete cepas mostraron resistencia con excepción de CM3, CM4 y CM9. Para Rifampicina solo la cepa CM8 mostró resistencia, mientras que para Estreptomomicina y Cloranfenicol todas las cepas fueron resistentes.

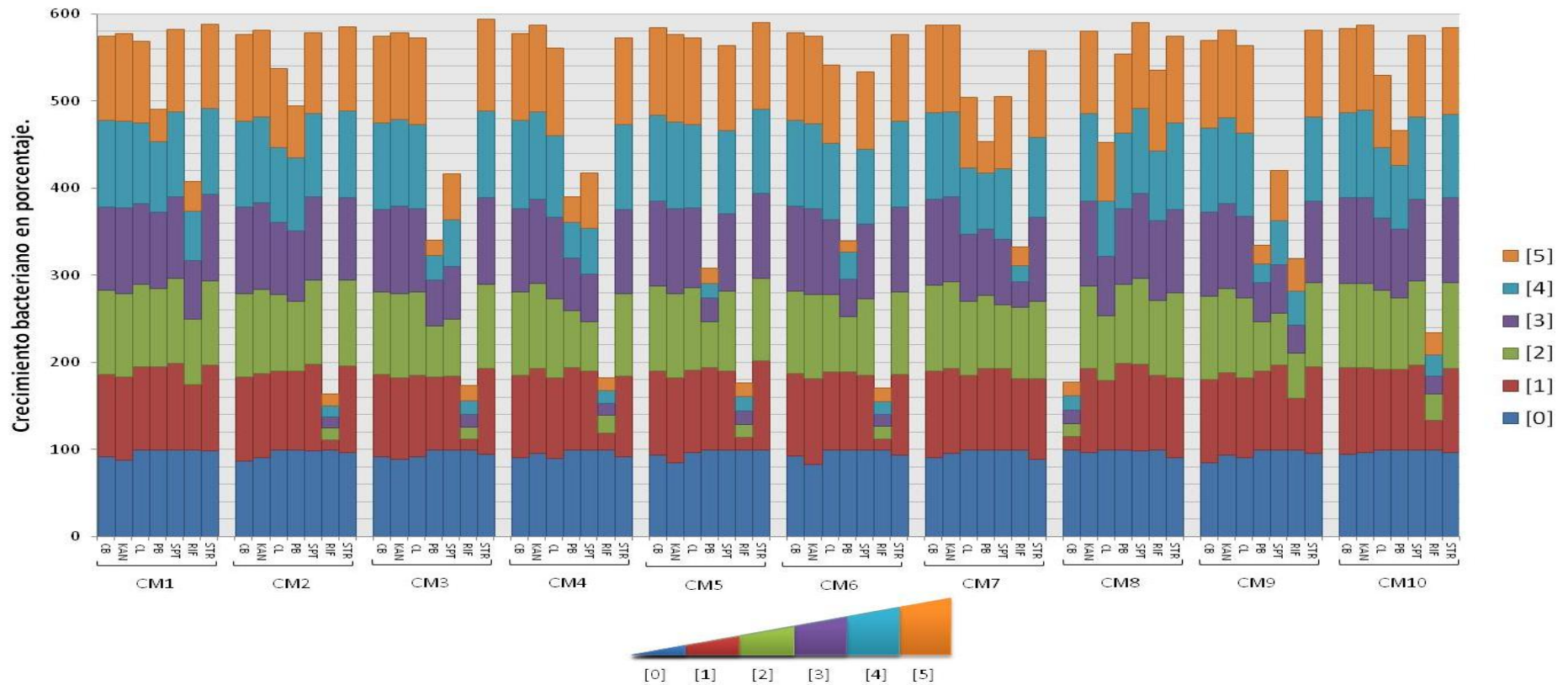


Figura 8. Susceptibilidad a los antibióticos. La gráfica muestra en el eje de las Y el crecimiento bacteriano en porcentaje, las barras en color azul representan una concentración cero (sin antibiótico), en color rojo concentración 1, en verde concentración 2, en morado la concentración 3, en azul claro concentración 4, en naranja la concentración 5. En el eje X se ubican los 7 antibióticos utilizados (CB, KAN, CL, PB, SPT, RIF, STR), además las 10 cepas experimentales, de CM1 a CM10.

Secuenciación del material plasmídico de la cepa CM6.

Se identificaron los genes *tra* y *trb* que participan en el ensemble del pili bacteriano, además del gen putativo *mobs* responsable de la movilización así como genes de conjugación como el gen *trwB*. En el análisis de la secuenciación también se encontró el gen *traT*, el cual parece ser estar jugando un papel importante para la eficiencia de la transferencia. El gen *finO* también fue identificado, éste está relacionado con la inhibición de la expresión del gen *traj*, proceso conocido como la inhibición de la proliferación. El plásmido cuenta también con una proteína iniciadora de la replicación, encontrada en el gen *repE*, así como genes *relE/parE* para el mantenimiento del plásmido toxina-antitoxina. También se encontró el gen CTX-M-14 responsable de la resistencia a Carbenicilina en la cepa CM6, este gen además se relaciona con resistencia a β -lactamasas en bacterias gram negativas.

Tabla 6. Genes en la cepa CM6. Lista de genes identificados en la secuenciación del plásmido de la cepa de *E. coli* CM6.

| Gen | Grupo funcional | Localización del producto | Referencia |
|------------------|--|---------------------------|-------------------------------|
| <i>traD</i> | Metabolismo del DNA | membrana interna | Firth y Skurray 1995 |
| <i>traE</i> | Ensamble del Pili | membrana interna | Fowler, <i>et al.</i> 1983 |
| <i>traG</i> | Ensamble del Pili y la estabilización agregada | membrana interna | Firth y Skurray 1992 |
| <i>tral</i> | Metabolismo del DNA | Citoplasma | Fowler y Thompson 1986 |
| <i>traJ</i> | Regulación | Citoplasma | Thompson y Taylor 1982 |
| <i>traL</i> | Ensamble del Pili | membrana interna | |
| <i>traM</i> | Metabolismo del DNA | Citoplasma | Thompson y Taylor 1982 |
| <i>traN</i> | Estabilización agregativa | Membrana externa | Huiguang <i>et al.</i> 2010 |
| <i>traT</i> | Exclusión de la superficie | Membrana externa | |
| <i>traU</i> | Ensamble del Pili | Periplasma | |
| <i>trbB</i> | Ensamble del Pili | Periplasma | |
| <i>trbC</i> | Ensamble del Pili | Periplasma | |
| <i>repE</i> | Proteína iniciadora de la replicación | Citoplasma | Sharma <i>et al.</i> 2004 |
| <i>mobs</i> | Mobilización del plásmido | | Francia <i>et al.</i> 2004 |
| <i>trwB</i> | Proceso de conjugación | Membrana integral | Gomis-Rüth <i>et al.</i> 2001 |
| <i>finO</i> | Regulación | Citoplasma | Yoshioka <i>et al.</i> 1987 |
| <i>relE/parE</i> | Sistema bacteriano toxina-antitoxina | Citoplasma | Goeders y Melderer 2014 |
| <i>ctx-m-14</i> | β -lactamasa | Citoplasma | Bonnet 2004 |

DISCUSIÓN

El propósito de este estudio fue caracterizar una colección de diez cepas aisladas de materia fecal de ganado con síntomas de diarrea, mediante su perfil plasmídico, pruebas a antibióticos de uso común, además de su identificación con ayuda del kit Biolog, 16S y el MALDI-TOF (Espectrometría de masas). Las diferencias en la identificación bacteriana observadas con el kit Biolog pueden ser debido a la presencia o ausencia de vías metabólicas específicas de cada cepa. Por otro lado si observamos específicamente si las cepas utilizan o no la fuente de carbono se obtienen datos interesantes, en cuanto a el uso de fuentes de carbono con naturaleza de carbohidratos no se nota una diferencia marcada entre el sustrato utilizado y las diez cepas experimentales, ya que en su mayoría son moléculas que intervienen en rutas metabólicas básicas para la obtención de energía, a excepción de algunos como el Tween 40, Tween 80, en estos se encuentra una diferencia en el uso por parte de las cepas. Por otro lado aquellas fuentes que son de origen ácido, se puede observar pocas diferencias entre las cepas, debido a que algunos elementos de igual manera entran a rutas metabólicas para obtener energía, sin embargo hay algunas fuentes que no son utilizadas por la mayoría de las cepas, como el ácido butírico y ácido aconítico. De igual manera es importante resaltar que el Sorbitol, un poli-alcohol es utilizado por las diez cepas, y es de esperar ya que bacterias patógenas de *E. coli* como serotipos O157:H7 no fermentan sorbitol (Doyle y Schoeni, 1984, Feng, 1995, Feng, *et al.* 1991), y es precisamente la ausencia de la capacidad para fermentar el sorbitol lo que nos ayuda a distinguir aislados de serotipos como el O157:H7 de otros no patógenos (Farmer y Davis, 1985, March y Ratnam, 1986), con esta información podríamos delimitar que las cepas de la colección no pertenecen a un serotipo como el antes señalado, sin embargo se ha observado el surgimiento esporádico de variantes, se ha reportado que el serotipo O157:H7 puede mutar y convertirse en positivo para el sorbitol (Fratamico, *et al.* 1993), pasando el D-Sorbitol a D-Sorbitol-6-fosfato mediante dos enzimas, y posteriormente es pasado

a D-Fructosa-6-fosfato para posteriormente entrar a rutas metabólicas para generar energía (Grenier, *et al.* 1985, Lengeler, 1975) (Tabla 4 y Tabla 5).

Las diez cepas de la colección han exhibido una multi-resistencia a antibióticos de uso común como lo son Carbenicilina, Kanamicina, Polimixina, Espectinomicina, Rifampicina y Estreptomina, a partir de este hecho hemos planteado la hipótesis de que esta resistencia pudo haber emergido a partir de cepas pre-existentes dotadas con esta capacidad, y dicha información genética fue transferida a las cepas que usamos en este trabajo (Bonnet 2004; Schoreder, *et al.* 2002). Tanto el perfil plasmídico como el perfil obtenido mediante pruebas a antibióticos sugieren una similitud entre las cepas CM3, CM5 y CM6, sugerimos que estas tres cepas pueden ser las mismas, sin embargo en las pruebas de Biolog se nota que hay mayor parecido entre las cepas CM5 y CM6, teniendo la cepa CM3 algunas diferencias en el uso de las fuentes de carbono (Figura 4, Figura 8, Tabla 5). Por otro lado la cepa CM8 mostro una diferencia contraria a las demás cepas, siendo resistente y sensible a antibióticos que las demás cepas no, sugerimos entonces que la cepa CM8 puede tener un origen distinto a las demás.

Con el fin de correlacionar los rasgos fenotípicos con la presencia de plásmidos, la Figura 4 muestra los perfiles de plásmido en electroforesis en gel de agarosa. De acuerdo con el sistema de replicación, dos plásmidos que no pueden coexistir en la misma célula se utilizan para la clasificación de incompatibilidad o grupos Inc (Couturier *et al.* 1988). Hemos secuenciado la incompatibilidad del grupo IncFII del plásmido de la cepa CM6 de *E. coli*. En los plásmidos F, el grupo de incompatibilidad IncFii está generalmente limitado a la familia *Enterobacteriaceae*, que incluye a *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Klebsiella* entre otros, esto puede explicar en menor medida el hecho de que en la prueba del kit Biolog obtengamos identificaciones de miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Couturier, *et al.* 1988; Mulec, *et al.* 2002; Yi, *et al.* 2010). Los plásmidos F se han caracterizado en más detalle y en gran variedad de plásmidos que codifican para la resistencia a antibióticos, así como los factores determinantes de virulencia y factores de

importancia ecológica, como las bacteriocitas que pertenecen a esta familia (Couturier *et al.* 1988; Mulec *et al.* 2002; Francia, *et al.* 2004; Yi *et al.* 2010).

En bacterias gram-negativas, la producción de β -lactamasas es la principal causa de resistencia a los antibióticos mediante distintos mecanismos (Shaw, *et al.* 1993, Mulec, *et al.* 2002; Bonnet 2004), el gen encontrado en la secuenciación de la cepa CM6, el CTX-M le da la propiedad de resistencia a β -lactamasas, y se ha demostrado que es un gen que codifica para una enzima que está ampliamente distribuida entre un amplio rango de bacterias, especialmente en las que forman la familia *Enterobacteriaceae* (Canton y Coque 2006). La familia del gen CTX-M está integrada por cuarenta enzimas las cuales pueden ser sub-clasificadas dentro del grupo CTX-M (Bonnet, 2004), muchos estudios han reportado cepas bacterianas productoras de CTX-M-14 en China, Honk Kong y Korea del Sur. Las cepas con más frecuencia portadoras de este gen son *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *E. cloacae*, y es de especial interés el reportar este tipo de genes presentes en el estado de Querétaro, ya que son genes que proveen una ventaja ecológica a las cepas de esta familia, esto nos indica que su dispersión es bastante amplia (Mulec *et al.* 2002; Xiong *et al.* 2002; Huiguang *et al.* 2010). La información bacteriana puede ser transferida de bacteria a bacteria cambiando su repertorio genético, este mecanismo es llamado transferencia horizontal y afecta la adaptación, especialización y evolución, como evidencia tenemos las diez cepas caracterizadas en este trabajo (Syvanen, 1985; Lipps, 2008).

Hemos secuenciado e identificado el plásmido de la cepa de *E. coli* CM6 como un homólogo cercano al plásmido pHK17a (Ho, *et al.* 2012). Un gran número de genes del plásmido F son responsables de la transferencia por conjugación y están involucrados en la síntesis del Pilus F, regulación, estabilización de agregación, exclusión de la superficie, metabolismo del DNA y el sistema toxina-antitoxina (Tabla 6).

En cuanto a la resistencia a antibióticos Mirzaagha y *col.* en el año 2011 elaboraron un análisis en Canadá sobre la prevalencia de resistencia en cepas de *E. coli* en becerros en engorda, los alimentos eran suplementados con antibióticos

a concentraciones sub-terapéuticas, encontraron entonces que resistencia por parte de los aislados a los antibióticos como Ampicilina, Cloranfenicol, Sulfametoxazol y Tetraciclina y no encontraron diferencia en los patrones de resistencia de las cepas aisladas, en este estudio encontramos si varían los patrones de resistencia entre las cepas y que no todas son susceptibles al mismo antibiótico, como la cepa CM8 que mostro resistencia a la Rifampicina cuando las demás se ven claramente inhibidas por este antibiótico, este proceso se observa también con la Carbenicilina pero de manera inversa entre la cepa CM8 y las demás.

En México Camacho y *col.* llevaron a cabo la detección de *Salmonella spp.* en viseras de pollo, hicieron una caracterización bioquímica y de resistencia a 18 antibióticos diferentes, ellos encontraron resistencia a antibióticos como Estreptomina y Tetraciclina, mientras que Ibar y *col.* probaron la resistencia a 15 diferentes antibióticos, amikacina, gentamicina, ciprofloxacina, cefalotina, cefotaxima, enrofloxacina, fosfomicina, polimixinaB, tetraciclina, cloranfenicol, estreptomina, trimetoprima-sulfametoxazol, ampicilina, nitrofurantoína y ácido nalidíxico, encontrando que un 73% de las cepas aisladas de *Salmonella spp.* fueron resistentes a todos los antibióticos utilizados, en los resultados obtenidos en este estudio podemos resaltar que a diferencia de los estudios anteriores la Polimixina afecta el crecimiento del 50% de los aislados de *E. coli*, el Cloranfenicol no produce efecto al igual que la Estreptomina.

En China Yang y *col.* una vez más caracterizaron cepas de *E. coli* multirresistentes, estas fueron aisladas de cerdos y pollos, caracterizaron genes de virulencia y mecanismos de resistencia, en las pruebas de susceptibilidad encontraron el 79% de las cepas fueron resistentes a Ampicilina, y 77% a Estreptomina, estos estudios dan evidencia de que cepas como *E. coli* y especies cercanas patógenas están presentes en carne destinada para el consumo humano.

En este estudio solo una cepa mostró no verse afectada por la presencia de los siete antibióticos aplicados, este es un dato parecido al de Ibar y col. donde una sola cepa fue resistente a más de diez antibióticos al igual que en el estudio de Yang y col. donde se encontró multirresistencia a nueve antibióticos en cepas de *E. coli*. En el análisis de este trabajo encontramos que cada cepa muestra resistencia a al menos cinco de los antibióticos probados, hallazgos similares se encuentran también en el estudio de Castaño y col, donde encontraron que el 78% de las cepas aisladas de *E. coli* analizadas mostraron multirresistencia a más de un antibiótico.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados son de ayuda para mejorar metodologías existentes para la caracterización de cepas con importancia infecciosa. Actualmente el surgimiento de microorganismos resistentes a antibióticos son de gran importancia biológica y de salud, tener herramientas para analizar su comportamiento es una fuerza que nos puede ayudar a controlar enfermedades infecciosas. En las diez cepas que se han estudiado en este trabajo, podemos decir que a pesar de que todas han sido identificadas como *E.coli*, cada una tienen su “*Huella digital*” propia, a excepción de la cepa CM5 y CM6, donde los datos sugieren que son la misma cepa, sin embargo todas ellas muestran tener una importancia clínica, ya que todas revelan ser resistentes a antibióticos de uso común. Solo fue posible secuenciar el plásmido CM6, y el análisis nos revela que contiene genes de importancia para su mantenimiento, resistencia a β -lactamasas, herramientas que le dan una ventaja ecológica. Finalmente, la caracterización de estas diez cepas ha proporcionado valiosa información para rastrear cepas patógenas en el estado de Querétaro.

PERSPECTIVAS

- Se propone la caracterización molecular detallada del plásmido encontrado en la cepa CM6 de *E.coli*.
- Analizar minuciosamente el uso de las distintas fuentes de carbono para clasificar de una manera más eficiente las cepas tratadas.
- Secuenciar, analizar, y comparar los plásmidos entre las diez cepas.
- Determinar el número de plásmidos en las cepas.

REFERENCIAS

- Austin, B. (1985). Antibiotic pollution from fish farms: Effects on aquatic microflora. *Microbiol. Sci.* 2:113–117.
- Barbosa, T. M. y Levy, S. B. (2000). The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Harcourt Publishers Ltd.* 3:303-311.
- Barton, M. D. (2000). Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nut. Res. Rev.* 13: 1–22.
- Bates, J., J. Z. Jordens, y D. T. Griffiths. (1994). Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man. *J. Antimicrob. Chemother.* 34:507–514.
- Birnboim, H. C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* Nov 24;7(6):1513–1523.
- Bonnet, R. (2004). Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 48:1–14.
- Canton, R. y Coque, T. M. (2006). The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol*; 9:466–475.
- Camacho, O., Acedo, L., Moreno, G., Sánchez, R., Castellón, L., Navarro, M. (2010). Detección de *Salmonella* resistente a los antibióticos en vísceras de pollo. *Biotecnia.* 12(1).
- Carattoli, A., Lovari S., Franco, A., Cordaro, G., Di Matteo, P. y Antonio Battisti. (2005). Extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2:833-835.

- Castaño, J., Botero, A., Betancur, O., Aricapa, H. (2008). Comportamiento de los principales antibióticos usados en avicultura frente a cepas respiratorias de E coli en pollos de engorde del municipio de Floridablanca (Santander Colombia) Biosalud. 7:11-20.
- Chee-Sanford, J. C., Aminov, R. I., Krapac, I. J., Garrigues-Jeanjean, N., Mackie, R. I. (2001). Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. Appl Environ Microbiol 67:1494-1502.
- Corpet, D. E. (1996). Microbiological hazards for humans of microbial growth promoter use in animal production. Rev. Med. Vet. 147:851–862.
- Council for Agricultural Science and Technology. (1981). Antibiotics in Animal Feeds. Report No. 88. Council for Agricultural Sciences and Technology, Ames, Iowa.
- Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P.L., y Maas, W.K. (1988). Identification and classification of bacterial plasmids. Microbiol Rev; 52:375–395.
- Couturier, M., Bex, F., Berquist, P. L. y Maas, W. K. (1988). Identification and classification of bacterial plasmid. Microb. Rev. 52:375-395.
- Crawford, L. M., y R. H. Teske. (1983). Growth promotants approved in the U.S. Vet. Res. Commun. 7:83–84.
- D'Costa, V. M., McGrann, M. K., Hyghes, D. W., Wright, G. D. (2006). Sampling the antibiotics resistoma. Science 311:374-377.
- Datta, N. y Hedges, R. W. (1972). R factors identified in Paris, some conferring gentamycin resistance, constitute a new compatibility group. Ann. Inst. Pasteur 123:849-852.

- Davies, J. (1994). Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*. 264:375-382.
- Díaz R, Solórzano F, Padilla G, Miranda M, González R, y Trejo, J. (2001). Infecciones nosocomiales. 2001. Experiencia en un hospital pediátrico de tercer nivel. *Salud Púb Mex*. 41:12-17.
- Dorn, C. R., Silapanuntakul, R., Angrick, E. J. y Shipman, L. D. (1992). Plasmid analysis and epidemiology of *Salmonella enteritidis* infection in three commercial layer flocks. *Avian Dis*. 36: 844-851.
- Doyle, M. P., y J. L. Schoeni. (1984). Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Appl. Environ. Microbiol.*48:855–856.
- Droumev, D. (1983). Review of antimicrobial growth promoting agents available. *Vet. Res. Commun*. 7:85–89.
- Dubnau, E. y Maas, W. K. (1968). Inhibition of replication of an F' lac Episome in Hfr cell of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. 95:531-539.
- Falagas, M. E. & Bliziotis, I. A. (2007). Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29, 630-636.
- Fantasia, M., Ricci, N., Manuppella, A., Martini, A. y Filetici, E. (1990). Phage type and DNA plasmid profile of *Salmonella typhimurium* isolates in the area of Isernia, Italy. *Epidemiol Infect*. 105: 317-323.
- Farmer, J. J., y B. R. Davis. (1985). H7 antiserum-sorbitol fermentation medium: a single tube screening medium for detecting *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J. Clin. Microbiol*. 22:620–625.
- Feng, P., R. Lum, y G. W. Chang. (1991). Identification of *uid A* gene sequences in β-D-glucuronidase-negative *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol*. 57:320–323.

- Feng, P. (1995). *Escherichia coli* serotype O157:H7: novel vehicles of infection and emergence of phenotypic variants. *Emerging Infect. Dis.* 1:47–52.
- Firth, N. y Skurray, R. (1992). Characterization of the F plasmid bifunctional conjugation gene *traG*. *Mol Gen Genet.* 232:145–153.
- Firth, N. y Skurray, R. (1995). A protein family associated with filament biogenesis in bacteria. *MolMicrobiol.* 17:1218–1219
- Fornasini, M., Reeves, R. R., Murray, B. E., Morrow, A. L. y Pickering, L. K. (1992). Trimethoprim-resistant *Escherichia coli* in households of children attending day care centers. *J Infect Dis.* 166: 326-330.
- Fowler, T., Taylor, L. y Thompson, R. (1983). The control region of the F plasmid transfer operon: DNA sequence of the *traJan tray* genes and characterisation of the *traY-Z* promoter. *Gene*; 26:79–89.
- Fowler, T. y Thompson, R. (1986). Shadow promoters in the F plasmid transfer operon. *Mol Gen Genet*; 202:509–511
- Francia, M. V., Varsaki, A., Garcillán-Barcia, M. P., Latorre, A., Drainas, C. y de la Cruz, F. (2004). A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol Rev.* 28:79-100.
- Fratamico, P. M., R. L. Buchanan, and P. H. Cooke. (1993). Virulence of an *Escherichia coli* O157:H7 sorbitol-positive mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:4245–4252.
- Frost, A. J. . (1991). Antibiotics and animal production. En *Science Microbiology of Animals and Animal Products*. New York: Elsevier: 181-194.
- Gayet, S., R. Chollet, G. Molle, J. Pages, y J. Chevalier. (2003). Modification of outer membrane protein profile and evidence suggesting an active drug pump in *Enterobacter aerogenes* clinical strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:1555-1559.

- Goeders, N. y Melderer, L. V. (2014). Toxin-antitoxin systems as multilevel interaction systems. *Toxins*; 6:304-324.
- Gilbert, D. N., Kohlhepp, S. J., Slama, K. A., Grunkemeier, G., Lewis, G., y Dworkin, R. J. (2001). Phenotypic resistance of *Staphylococcus aureus*, selected *Enterobacteriaceae*, and *Pseudomonas aeruginosa* after single and multiple in vitro exposures to ciprofloxacin, levofloxacin, and trovafloxacin. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 45:883-892.
- Gomis-Rüth, F. X., Moncalián, G., Pérez-Luque, R., González, A., Cabezón, E., de la Cruzm F. y Coll M. (2001). The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F-ATPase. *Nature*; 409:637-641.
- Grenier, F. C., I. Hayward, M. J. Novotny, J. E. Leonard, and M. H. Saier. (1985). Identification of the phosphocarrier protein enzyme III_{gut}: essential component of the glucitol phosphotransferase system in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 161:1017–1022.
- Gross, R. J., Ward, L. R., Threlfall, E. J., Cheasty, T. y Rowe B. (1998). Drug resistance among *Escherichia coli* strains isolated from cerebrospinal fluid. *J Hyg Camp.* 90:195-198.
- Gross, R. J., Ward, L. R., Threlfall, E. J., Cheasty, T. y Rowe, B. (1998). Drug resistance among *Escherichia coli* strains isolated from cerebrospinal fluid. *J Hyg Camp.* 90:195-198.
- Gstalter, M. E., Faelen, M., Mine, N., Top, E. M., Mergeay, M. y Couturier, M. (2003). Replication functions of new broad host range plasmid isolated from polluted soils. *Res. Microbiol.* 154:499-509.
- Guardabassi, L. y Courvalin, C. (2006). Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. En *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*(1-18). Washington, D. C.: Aarestrup.

- Guinan J, McGuckin M, Shubin A, y Tighe, J. (2005). A descriptive review of malpractice claims for health care-acquired infections in Philadelphia. *Am J Infect Control*. 33: 310-312.
- Hale, T. L. y Keusch, G. T. (1996). *Shigella*. En: *Medical Microbiology*. Eds: Baron, S., Peake, R. C., James, D. A., Susman, M., Kennedy, C. A., Durson Singleton, M. J. y Schuenke, S. Cuarta edición. Universidad de Texas. Galveston, Texas.
- Hall, R. M., y C. M. Collis. (1995). Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol. Microbiol*. 15:593-600.
- Hanzawa, T., Oka, C., Ishiguru, N., Sato, G. (1984). Antibiotic-resistant coliforms in the waste of piggeries and dairy farms. *Nihon Juigaku Zasshi*. 46(3):363-72.
- Hays, V. W. (1986). Benefits and risks of antibiotics use in agriculture. En *Agricultural uses of antibiotics*(74-78). Washington, DC: Chemical Society.
- Ho, P. L., Lo, W. U., Yeung, M. K., Li, Z., Chan, J., Chow, K. H., Yam, W. C., Tong, A., Bao, J., Lin, C. H., Lok, S. y Chiu, S. (2012). Dissemination of pHK01-like incompatibility group incFII plasmids encoding CTX-M-14 in *Escherichia coli* from human and animal sources. *Vet Microbiol* 2012;158:172-179.
- Holmes, B., Costas, M., Ganner, M., On, S. L. W. y Stevens, M. (1994). Evaluation of biologic system for identification of some gram-negative bacteria of clinical importance. *American Society of Microbiology*. 32:1970-1975.
- Hopkins, K. L., Liebana, E., Villa, L., Batchelor, M., Threlfall, E. J. y Carattoli, A. (2006). Replicon typing of plasmid carrying CTX-M or CMY β -lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates. *Ant. Agents Chemother*. 50:3203-3206.
- Huiguang, Y., Yali, X., Jing, L., Junrong, W., Jinyu, W., Teng, X., We,i C., Biaobang, C., Meili, L., Huan, W., Mingming, Z., Jinsong, L., Zuyuan, X., Shouguang, J. y Qiyu, B. (2010). Sequence analysis of pKF3-70 in *Klebsiella pneumoniae*: Probable Origin from R100-Like Plasmid of *Escherichia coli*. *PLoS One*; 5:1–9.

- Ibar, M., Vigo, G., Pineyro, P., Caffer, M., Quiroga, P. (2009) Perfumo C, Centron C, Giacoboni G. Serovariedades de Salmonella enterica subespecie enterica en porcinos y su resistencia a los antimicrobianos. Revista Argentina de Microbiología 41:156-162.
- Institute of Medicine (IOM). (1989). Humanhealth risks with subtherapeutic use of penicillin or tetracyclines in animal feed. Committee on human health risk assessment on using subtherapeutic antibiotics in animal feeds. National Academy Press, Washington, DC
- Jones, R. N y Pfaller, M. A. (1998). Bacterial Resistance: Worldwide Problem. Diagn Microbiol Infect Dis. 31:379-388.
- Jones, R. N. y Pfaller, M. A. (1998). Bacterial resistance: A worldwide problema. Diagn Microbiol Infect Dis. 31:379-388.
- Kaper, J. B. (2005). Pathogenic Escherichia coli. Int. J. Medical Microbiol. 295:355-356.
- Kaper, J. B., Navarro, J. P. y Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. Nat. Rev. Microbiol. 2:123-140.
- Karlowsky, J. A., Kelly, L. J., Thornsberry, C., Jones, M. E. y Sahm D. F. (2002). Trends in antimicrobial resistance among urinary tract infection isolates of Escherichia coli from female outpatients in the United States. Antimicrob Agents Chemother. 46:2540–2545.
- Karlowsky, J. A., Kelly, L. J., Thombsberry, C., Jones, M. E. and Sahm, D. F. (2002). Trends in antimicrobial resistance among urinary tract infection isolates of *Escherichia coli* from female out patients in the United States. Antimicrob chemother, 46:2540-2545.
- Kaye, K. S., H. S. Fraimow, y E. Abrutyn. (2000). Pathogens resistant to antimicrobial agents. Epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. Infect. Dis. Clin. North Am. 14:293-319.

- Kohanski, M. A., M. A. DePristo, y J. J. Collins. (2010). Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol. Cell.* 37:311-320.
- Lengeler, J. (1975). Nature and properties of hexitol transport systems in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 124:39–47.
- Levy, S. B., J. P. Burke, y C. K. Wallace. (1987). Antibiotic use and antibiotic resistance worldwide. *Rev. Infect. Dis. (Suppl. 3)*:9.
- Liebana, E., Batchelor, M., Hopkins, K. L., Clifton-Hadley., F. A., Teale, C. J., Foster., A., Barker, L., Threlfall, E. J. y Davies, R, H. (2006). Longitudinal farm study of extended-spectrum beta-lactamase-mediated resistance. *J. Clin. Microbiol.* 44:1630-1634.
- Lipps G. (2008). Plasmids: current research and future trends. Caister Academic Pr, Norwich, UK.
- Llop, A. L., Valdés-Dapena, M. M., Zuazo, J. L. (2001). Microbiología y Parasitología Médicas. Ciudad de la Habana. Editorial de Ciencias Médicas.
- Maas, R. y Maas, W. K. (1962). Introduction of a gene from *Escherichia coli* B into Hfr and F strains of *Escherichia coli* K12. *Proc Natl. Acad. Sci USA* 48:1887-1893.
- Madigan, M. T., MArtinko, J. M. y Parker, J. 2003. Brock. Biology of Microorganims ed. Pearson. Prentice Hall.
- March, S. B., y S. Ratnam. (1986). Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J. Clin. Microbiol.* 23:869–872.
- McClintok, B. (1950). The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 36:344-355.

- Mirzaagha, P., Louie, M., Sharima, R., Yanke, Topp, E., McAllister, T. (2011). Distribution and characterization of ampicillin and tetracycline-resistant *Escherichia coli* from feedlot cattle fed sub therapeutic antimicrobials. BMC Microbiology. 11(78):1-15.
- Mulec, J., Starčič, M. y Žgur-Bertok, D. (2002). F-like plasmid sequences in enteric bacteria of diverse origin with implication of horizontal transfer and plasmid host range. Curr Microbiol; 44:231–235.
- Nataro, J. P and Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11(1):142.
- Navarrete N y Pérez R. (1998). Definiciones de infección intrahospitalaria. En: Infección intrahospitalaria en Pediatría. México: McGraw Hill. pp 18-24.
- Owens R y Rice L. Hospital-based strategies for combating resistance. (2006). Clin Infect Dis. 42: S173-181.
- Pfaller, M. A., Ehrhardt, A. F. y Jones, R. N. (2001). Frequency of pathogen occurrence and antimicrobial susceptibility among community-acquired respiratory tract infections in the respiratory surveillance program study: Microbiology from the medical office practice environment. Am J Med. 111 Suppl 9A: 4S-12S.
- Platt, D. J., Sommerville, J. S., Kraft, C. A. y Timbury, M. C. (1984). Antimicrobial resistance and the ecology of *Escherichia coli* plasmids. J Hyg Camb. 93: 181-188.
- Ramos C. y Pelez G. Repercusión económicosocial de la infección intrahospitalaria. (1991). Rev Cub Salud Púb. 17(2):84-93.
- Relman, D. (1999). The search for unrecognized pathogens. Science. 284: 1308–1310, 1999.
- Relman, D., Schmidt, T., MacDermott, R. y Falkow, S. N. (1992). Identification of the uncultured Bacillus of Whipple's disease. Engl J Med. 327: 293–301.

- Ruiz, J. (2003). Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J. Antimicrob. Chemother.* 51:1109-1117.
- Sader, H. S., Pfaller., M. A. y Hollis, R. J. (1995). The use of molecular techniques in the epidemiology and control of hospital infectious. *Clin Lab Med.* 15: 407-431, 1995
- Sawant, A. A., Sordillo, L. M., Jayarao, B. M. (2005). A survey on antibiotic usage in dairy herds in Pennsylvania. *J Dairy Sci* 88:2991-2999.
- Scaife, J. y Gross, J. D. (1962). Inhibition of multiplication of an F-lac factor in Hfr cells of *Escherichia coli* K12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 7:403-407.
- Schaberg, D. R., Tompkins, L. S. y Falkow, S. (1981). Use of agarose gel electrophoresis of plasmid deoxyribonucleic acid to fingerprint gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol.* 13: 1105-1110.
- Schorede CM, Zhao C, DebRoy C, Torcolini J, Zhao S, White DG, Wagner DD, McDermott PF, Walker RD, Meng, J. (2002). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine and food. *Appl Environ Microb*; 68:576–581.
- Sharma, S., Sathyanarayana, B. K., Bird, J. G., Hoskins, J. R., Lee, B. y Wickner, S. (2004). Plasmid PI repA is homologous to the F plasmid repE class of initiators. *J BiolChem*; 279:6027–6034.
- Shaw, K. J., P. N. Rather, R. S. Hare, y G. H. Miller. (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol. Rev.* 57:138-163.
- Shitandi, A., and A. Sternesjo. (2004). Factors contributing to the occurrence of antimicrobial drug residues in Kenyan milk. *J. Food Prot.* 67:399–402.

- Smith, H. Williams y Parsell, Z. (1975). Transmissible substrate utilizing ability in the enterobacteria. *Journal of General Microbiology*. 87:129-140.
- Summers, D. K. (1996). *The biology of plasmid*. Osney, Oxford OX: Blackwell Science. Inglaterra.
- Syvanen, M. (1985). Cross-species gene transfer; implications for a new theory of evolution. *J. Theor. Biol.* 112:333-343.
- Tang, Y. W., Ellis, N. M., Hopkins, K., Smith, D. H., Dodge, D. E. y Persing, D. H. (1998). Comparison of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusual aerobic pathogenic gram-negative bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*. 12:3674-3679.
- Tenover, F. C., and J. E. McGowan. (1996). Reasons for the emergence of antibiotic resistance. *Am. J. Med. Sci.* 311:9–16.
- Toma, C., Lu, Y., Higa, N., Nakasone, N., Chinen, I., Baschkier, A., Rivas, M. y Iwanaga, M. (2003). Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Chin Microbiol.* 41:2669-2671.
- Thompson, R. y Taylor, L. (1982). Promoter mapping and DNA sequencing of the F plasmid transfer genes traM and traJ. *Mol Gen Genet*; 188:513–518.
- U.S. International Trade Commission. (1987). *Synthetic Organic Chemicals: United States Production and Sales, 1950-1986*. U.S. Government Printing Office, Washington, DC.
- US Food and Drug Administration. (2009). Summary Report on Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals.2010. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/ForIndustry/UserFees/AnimalDrugUserFeeActADUF/UCM231851.pdf>. Accessed: 19 August 2013.

US Food and Drug Administration: Guidance for Industry #209: The Judicious Use of Medically Important Antimicrobial Drugs in Food-Producing Animals. (2012). Available at: <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/UCM216936.pdf>. Accessed: 19 August 2013.

US Food and Drug Administration: Letter to The Honorable Louise M. Slaughter. (2011). Available at: http://www.louise.house.gov/images/stories/FDA_Response_to_Rep._Slaughter.pdf. Accessed: 19 August 2013 World Health Organization: The Evolving Threat of Antimicrobial Resistance: Options for Action. 2012. Available at: http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241503181_eng.pdf. Accessed: 19 August 2013.

Waschmut, I. K., Griffin, P. M. y Wells, J. G. (1991). *Escherichia coli* O157:H7, a cause of hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *Acta Paediatr Jpn.* 33:603-612.

World Health Organization. (2002). Antimicrobial Resistance. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/print.html> [Electronic version].

Xiong, Z., Zhu, D., Wang, F., Zhang, Y. y Okamoto, R. (2002). Investigation of extended-spectrum beta-lactamase in *Klebsiellae pneumonia* and *Escherichia coli* from china. *DiagnMicrobiol Infect Dis*; 44:195–200.

Yang, H., Chen, S., While, D., Zhao, S., Mc Dermantt, P., Walker, R., Merig, J. (2004) Characterization of multipleantimicrobial- resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chicken and swine in China. *Journal of Clinical Microbiology.* 42(8):3483-3489.

Yi, H., Xi, Y., Liu, J., Wang, J., Wu, J., Xu, T., Chen, W., Chen, B., Lin, M., Wang, H., Zhou, M., Li, J., Xu, Z., Jin, S. y Bao, Q. (2010). Sequence analysis of pKF3-70 in *Klebsiella pneumonia*: probable origin from R100-like plasmid of *Escherichia coli*. *PLoS One*; 5:1–9.

Yoshioka, Y., Ohtsubo, H. y Ohtsubo, E. (1987). Repressor gene *finO* in plasmids R100 and F: constitutive transfer of plasmid F is caused by insertion of IS3 into *FfinO*. *J Bacteriol*; 169:619–623.

Zwald, A. G., P. L. Rugg, J. B. Kaneene, L. D. Warnick, S. J. Wells, C. Fossler, and L. W. Halbert. (2004). Management practices and reported antimicrobial usage on conventional and organic dairy farms. *J. Dairy Sci.* 87:191–201.