



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“desarrollo y validación de un ensayo molecular para la detección del gen *mcr* en cepas de *salmonella enterica* resistentes a la colistina”

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO EN
MAESTRO EN QUÍMICA CLÍNICA DIAGNÓSTICA**

PRESENTA

QFB. JOSUE ALDAIR PUC CUPUL

DIRIGIDO POR:

DR. GERARDO MANUEL NAVA MORALES

QUERÉTARO, QRO. A DICIEMBRE DE 2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



desarrollo y validación de un ensayo molecular para la
detección del gen mcr en cepas de Salmonella
enterica resistentes a la colistina

por

JOSUE ALDAIR PUC CUPUL

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

Clave RI: FQMAC-309166

FACULTAD DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN QUÍMICA CLÍNICA DIAGNÓSTICA

“DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN ENSAYO MOLECULAR PARA LA
DETECCIÓN DEL GEN *mcr* EN CEPAS DE *Salmonella enterica* RESISTENTES A
LA COLISTINA”

Tesis

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN QUÍMICA CLÍNICA DIAGNÓSTICA

Presenta

Q.F.B JOSUE ALDAIR PUC CUPUL

Dirigido por:

DR. GERARDO MANUEL NAVA MORALES

DR GERARDO MANUEL NAVA MORALES
PRESIDENTE

FIRMA

M.I.M DAVID GUSTAVO GARCÍA GUTIERREZ
SECRETARIO

FIRMA

DRA. KARLA ISABEL LIRA DE LEÓN
VOCAL

FIRMA

M. EN C ALMA DELIA BERATILLO JULOTE
SUPLENTE

FIRMA

M. EN C. CAROLINA NATHALIE RESENDIZ NAVA
SUPLENTE

FIRMA

Centro Universitario, Querétaro, Gro.
ENERO 2024
México

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por otorgarme la beca CVU 1143324, que hizo posible la realización de este proyecto y mi formación

Al programa en Maestría Química Clínica Diagnóstica de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, que con su excelente grupo académico hizo posible mi crecimiento profesional.

Al laboratorio de Biología Molecular y a la Unidad de Servicios Clínico de la Universidad Autónoma de Querétaro, por brindarme las instalaciones y materiales necesarios.

DEDICATORIAS:

Dedico este trabajo a mi familia, mis padres Catalino Puc y Herlinda Cupul por siempre creer en mí y apoyar cada una de mis decisiones. Su amor incondicional ha sido mi motor y jamás podría terminar de pagarles todo el apoyo. A Jadeth Puc, mi hermana. Gracias por siempre estar para mí, por todos los consejos y complicidad a lo largo de todo este camino.

A Ramón, por siempre alentarme a seguir este sueño desde el primer momento cuando solo era una idea, tu apoyo hizo más fácil cada una de las pruebas que tuve que pasar.

A Iván, Flor, Francisco, Jesús y Carolina, mis compañeros de laboratorio que terminaron siendo mis amigos. El día a día con ustedes siempre estuvo lleno de risas, compañerismo y mucho aprendizaje.

A mis colegas de maestría, a Delia, Gabriel, Laura, Dani y Francisco. Compartir este reto con ustedes hizo todo más fácil. Gracias por siempre brindarme su amistad y apoyo en todo lo que pudieran.

A mi comité sinodal. A la Dra. Karla por siempre estar dispuesta a brindarme su apoyo y consejo en cada parte de este camino, además de hacerme parte de su equipo de trabajo. A la M.C. Alma, por cada clase y tiempo dedicado a este trabajo, sus contribuciones ayudaron siempre a mejorar la calidad de este. Al MIM David, por siempre compartir su conocimiento conmigo. A la Dra. Carolina, por todo el tiempo invertido en la realización de este proyecto, por enseñarme y capacitarme siempre en el laboratorio con paciencia. Al Dr. Gerardo Nava, por dirigir este trabajo y abrirme las puertas de su laboratorio, por todo el conocimiento compartido y cada reto que me ayudó a superar.

Índice general	
Índice de cuadros	6
Índice de figuras	7
Abreviaturas	8
Resumen	9
Abstract	10
1 Introducción	12
2 Antecedentes	15
2.1 Resistencia antimicrobiana desde el enfoque de Una Salud.	15
2.2 Resistencia a los antibióticos.	16
2.3 La colistina	17
2.3.1 Resistencia a la colistina	20
2.3.2 Genes <i>mcr</i> (mobile colistin resistance)	21
2.4 <i>Salmonella enterica</i>	22
2.4.1 Características de <i>Salmonella enterica</i>	22
2.4.2 Salmonelosis en humanos	24
2.4.3 Genes <i>mcr</i> en <i>Salmonella enterica</i>	25
2.5 Métodos de detección de resistencia a los antibióticos.	26
3 Objetivos	30
3.1 General	30
3.2 Particulares	30
4 Metodología	31
4.1 Diseño	31
4.1.1 Definición del Universo	31
4.1.2 Tamaño de muestra	31
4.1.3 Definición de las unidades de observación	31
4.1.4 Criterios de inclusión	31
4.1.5 Criterios de exclusión	32
4.1.6 Criterios de eliminación	32
4.1.7 Definición de variables y unidades de medida	32
4.2 Materiales	32
4.2.1 Equipo	32
4.2.2 Medios de cultivo.	32
4.2.3 Soluciones.	33

4.2.4	Reactivos	33
4.2.5	Material biológico	33
4.3	Métodos	34
4.3.1	Análisis de los diferentes alelos del gen <i>mcr</i> y selección de iniciadores de PCR para su efectiva detección.	34
4.3.2	Diseño y validación de la PCR multiplex capaz de caracterizar la diversidad del gen de <i>mcr</i> en <i>S. enterica</i>	35
4.3.3	Evaluación de la resistencia a la colistina a través de ensayos fenotípicos de microdilución en caldo.	39
4.4	Manejo de Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos.	41
4.5	Resultados y discusión.	42
4.5.1	Análisis de los diferentes alelos del gen <i>mcr</i> y selección de iniciadores de PCR para su efectiva detección.	42
4.5.2	Diseño y validación de un ensayo de PCR multiplex capaz de caracterizar la diversidad de del gen <i>mcr</i> en <i>S. enterica</i> .	44
4.5.3	Evaluación de la resistencia a la colistina a través de ensayos fenotípicos de microdilución en caldo.	47
5	Conclusiones.	50
6	Referencias	51

Índice de cuadros

Tabla 1. Clasificación taxonómica de acuerdo con la secuenciación del gen 16S <i>rRNA</i> de <i>Salmonella enterica</i> .	23
Tabla 2: Definición de las unidades de observación.	31
Tabla 3. Características de la variable	32
Tabla 4: Genes <i>mcr</i> que codifican para proteínas fosfoetanolamina transferasas que confieren resistencia a la colistina que se han reportado en <i>Salmonella</i>	34
Tabla 5: Lista de iniciadores utilizados para la detección de <i>mcr-1</i> , <i>mcr-2</i> , <i>mcr-3</i> , <i>mcr-4</i> , <i>mcr-5</i> , <i>mcr-9</i> .	39

Índice de figuras

Figura 1. Estructura básica de la colistina.	18
Figura 2. Acción de la colistina sobre la membrana bacteriana externa.	19
Figura 3. Diferentes mecanismos moleculares relacionados con la resistencia a la colistina en Enterobacteriaceae.	20
Figura 4: Secuencias de los controles de amplificación 1 y 2 empleadas como control positivo y sitios de alineación de los pares de iniciadores para mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4, mcr-5 y mcr-9.	36
Figura 5: Visualización de las bandas en gel de agarosa (1,5%) para las tres PCR dúplex	44
Figura 6: PCR multiplex a muestras de <i>S. enterica</i> con CMI 2µg/ml.	45
Figura 7: Número de cepas de <i>S. enterica</i> y su concentración mínima inhibitoria ante la colistina por el método de microdilución en caldo.	47

Abreviaturas

<i>LPS</i>	Lipopolisacáridos
<i>CIA</i>	Control Interno de Amplificación
<i>MRA</i>	Multirresistente a los antibióticos
<i>mcr</i>	Resistencia a colistina movilizada (mobilized colistin resistance)
<i>ST</i>	Soya-tripticasa
<i>XLD</i>	xilosa lisina desoxicolato
<i>CMI</i>	Concentración mínima inhibitoria
<i>CDCP</i>	Centros de Estados Unidos para El Control de Enfermedades (The Centers for Disease Control and Prevention)
<i>CLSI</i>	Instituto de estándares para el laboratorio clínico. (Clinical and Laboratory Standards Institute)
<i>OMS</i>	Organización Mundial de la Salud
<i>CMI</i>	Concentración Mínima Inhibitoria

Resumen

El aumento en la resistencia a los antibióticos observados entre los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* de importancia clínica como *Salmonella enterica*, ha propiciado la reincorporación de antimicrobianos en desuso como la colistina, antibiótico de última línea de defensa ante bacterias multirresistentes; sin embargo, el uso desmedido de este antibiótico como promotor de crecimiento en la industria animal ha favorecido el desarrollo de bacterias resistentes a la colistina. En el año 2016, se reportó por primera vez un gen de transmisión horizontal mediado por plásmidos denominado *mcr-1*, el cual codifica una fosfoetanolamina transferasa que confiere resistencia a la colistina. Desde entonces, se han reportado 10 diferentes variantes del gen *mcr* alrededor del mundo (*mcr-1* a *mcr-10*), lo que representa un importante problema de salud pública. En este trabajo se desarrolló un protocolo de 3 PCR dúplex, capaz de detectar las seis variantes más prevalentes del gen *mcr*, reportados en *S. enterica* (*mcr-1*, 2, 3, 4, 5 y 9). Esta herramienta se implementó para evaluar la prevalencia y diversidad del gen *mcr* en 88 aislamientos de *S. enterica* pertenecientes al programa de monitoreo permanente de *S. enterica* con potencial zoonótico del Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro de muestras de productos avícolas, además de implementar ensayos para la detección de la expresión fenotípica a través de ensayos de microdilución en caldo, donde la CMI más alta fue de 2 µg/ml en 12/88 de las cepas, representada en un 91.6% por el serotipo enteritidis. Ninguna de las cepas de *S. enterica* fue positiva para la presencia del gen *mcr*. El establecimiento de esta estrategia permitirá el monitoreo de *S. enterica* resistente a colistina en muestras ambientales, zoonóticas y clínicas.

Palabras clave: PCR multiplex, *mcr*, *Salmonella enterica*, colistina.

Abstract

The increase in antibiotic resistance observed among clinically significant members of the *Enterobacteriaceae* family, such as *Salmonella enterica*, has led to the reintroduction of previously disused antimicrobials like colistin. Colistin serves as a last-line defense antibiotic against multidrug resistant bacteria. However, the excessive use of this antibiotic as a growth promoter in the animal industry has contributed to the development of colistin-resistant bacteria. In 2016, the first horizontally transmitted plasmid-mediated gene called *mcr-1* was reported. This gene encodes a phosphoethanolamine transferase that imparts resistance to colistin. Since then, 10 different variants of the *mcr* gene have been reported worldwide (*mcr-1* to *mcr-10*), posing a significant public health issue. In this study, a protocol for 3 different duplex PCR was developed to detect the six most prevalent variants of the *mcr* gene reported in *S. enterica* (*mcr-1*, 2, 3, 4, 5, and 9). This tool was implemented to assess the prevalence and diversity of the *mcr* gene in 88 *S. enterica* isolates from the ongoing monitoring program for potentially zoonotic *S. enterica* at the Laboratory of Molecular Microbiology, Faculty of Chemistry, Autonomous University of Querétaro. The samples were derived from poultry products. Additionally, assays were conducted to detect phenotypic expression through broth microdilution tests, where the highest MIC was 2 µg/mL in 12/88 strains, with 91.6% represented by the Enteritidis serotype. None of the *S. enterica* strains tested positive for the presence of the *mcr* gene. The establishment of this strategy will enable the monitoring of colistin-resistant *S. enterica* in environmental, zoonotic, and clinical samples.

Key words: multiplex PCR, *mcr*, *Salmonella enterica*, colistin.

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

1 Introducción

El aumento en el aislamiento de microorganismos multirresistentes a los antibióticos, a partir de muestras clínicas, ambientales y zoonóticas representa un importante problema para la salud pública (Gargano et al., 2021). Entre estos microorganismos, destacan los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, bacterias Gram-negativas que poseen una membrana exterior formada por proteínas, fosfolípidos y lipopolisacáridos que les confieren una barrera a algunas moléculas, como los antibióticos (J. Li et al., 2020). Además, *Enterobacteriaceae* se ha caracterizado por su alta tasa de resistencia a antibióticos, ya sea desarrollando o adquiriendo mecanismos genéticos de resistencia (Aghapour et al., 2019).

El aumento en la resistencia a antibióticos ha provocado que los antimicrobianos de primera línea pierdan su eficacia, dejando de ser una opción viable. En consecuencia, se han desarrollado nuevas generaciones de antibióticos o la modificación química de los ya conocidos (Aghapour et al., 2019); sin embargo, el uso indebido, la falta de finalización de los tratamientos y diagnósticos inadecuados son señalados como principales responsables del incremento en la resistencia a antibióticos de última línea como el carbapenem, imipenem, vancomicina, entre otros (Mohapatra et al., 2021). Actualmente se buscan alternativas que permitan controlar a estos patógenos, ya que se calcula que, para el 2050, la RAM ocasionará la pérdida de diez millones de vidas cada año. Esto generará un impacto económico global que se estima en alrededor de \$100 billones de dólares (Gordillo-Altamirano & Barr, 2019).

Una opción antimicrobiana para el tratamiento de enfermedades causadas por *Enterobacteriaceae* presentando un auge importante en años recientes, principalmente en casos de bacterias MRA es la colistina (Rau et al., 2020). La colistina (polimixina E) fue retirada de la práctica clínica alrededor de 1970, al mostrar efectos adversos como neurotoxicidad y nefrotoxicidad (Mendes-Oliveira et al., 2019). Los riesgos del uso de la colistina son conocidos; sin embargo, estos pasan a un segundo plano cuando este antibiótico representa el último recurso para

combatir a los microorganismos MRA (El-Sayed et al., 2020). El mecanismo por el que actúa la colistina se atribuye a la carga positiva de su estructura química, permitiéndole verse atraído electrostáticamente al lípido A en los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana externa con carga negativa, provocando desestabilización de la membrana, fuga de contenido citoplásmico y lisis celular (Ling et al., 2020).

Hasta hace algunos años, la resistencia a la colistina era dada a través de mecanismos de resistencia transmisibles únicamente de manera vertical, por lo que la preocupación de diseminación a otros géneros se consideraba baja (Moffatt et al., 2019). En 2016, se describió por primera vez, en una cepa de *E. coli*, un gen denominado *mcr-1* (mobilized colistin resistance), presente en un plásmido que proporciona resistencia a la colistina (Liu et al., 2016). Desde entonces, se han descrito múltiples variantes de este gen que codifica proteínas MCR, fosfoetanolaminas transferasas que catalizan la unión de fosfoetanolamina al lípido A, reduciendo la carga negativa del LPS, generando resistencia a la colistina (Wang et al., 2020). La preocupación de diseminación de este gen entre la familia *Enterobacteriaceae* de relevancia clínica, como *Salmonella enterica*, ha propiciado la vigilancia epidemiológica del gen *mcr* alrededor del mundo; los estudios se enfocan en identificar su prevalencia, mecanismos de transferencia y nuevas variantes (Yinxia-Li et al., 2021). Actualmente, el gen *mcr* entre miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, está diseminado en varias regiones del mundo como Asia, Europa, Norteamérica, África y el Medio Oriente (Mmatli et al., 2022). En México, existe poca información acerca de este gen; por ejemplo, en animales, en el 2018 y 2019, se reportó la presencia de *mcr-1* en *E. coli* proveniente de muestras fecales de cerdos (Garza-Ramos et al., 2018; Rodríguez-Santiago et al., 2022). En humanos, se reportó *1mcr-1* en *E. coli* proveniente una de muestra fecal de paciente pediátrico oncológico (Merida-Vieyra et al., 2019).

La escasa cantidad de reportes en México pudiera deberse a dificultades técnicas para realizar estos estudios moleculares en los hospitales. Por esta razón, el desarrollo de ensayos moleculares para la identificación de genes de resistencia

que brinden información rápida, precisa, y sensible es de vital importancia en los laboratorios clínicos y hospitales. Una técnica molecular para la búsqueda de genes *mcr* podría ayudar a identificar la prevalencia de estos en el país, lo que serviría para la toma de decisiones tanto clínicas para la elección del tratamiento ideal como epidemiológicas para evitar su diseminación. Por consiguiente, el objetivo de este trabajo fue desarrollar y estandarizar un ensayo de PCR multiplex para detectar la prevalencia y diversidad de determinantes genéticos del gen *mcr*, que confiere resistencia a colistina en aislamientos de *S. enterica*.

2 Antecedentes

2.1 Resistencia antimicrobiana desde el enfoque de Una Salud.

Una Salud, de acuerdo con la definición de los Centros de Estados Unidos para El Control de Enfermedades (CDCP, por sus siglas en inglés) hace referencia a un proyecto multidisciplinario, que busca trabajar en todos los niveles, con el único propósito de mejorar la salud, resaltando la interconexión que existe entre personas, animales, plantas, y medio ambiente (Sinclair, 2019). Para poder lograr esto, el enfoque Una Salud requiere el desarrollo de investigaciones que abarquen a todos los ámbitos involucrados, desarrollando entre su personal mejores capacidades clínicas para una rápida respuesta ante los problemas que busca hacer frente éste enfoque. De igual manera, es crucial que la toma de mejores decisiones desde la política de las distintas instituciones, así como la comunicación entre las partes interesadas, superando la burocracia que estas implican (Aguirre et al., 2019). Entre los objetivos del enfoque Una Salud, está el atender las enfermedades causadas por animales, la resistencia antimicrobiana, la inocuidad y seguridad alimentaria, contrarrestar la contaminación y cualquier otra amenaza, para la salud de los animales, personas, y medio ambiente (CDCP, 2022).

El tener un mejor entendimiento sobre la manera en que estas amenazas ocurren y se propagan, puede ayudar a la mejor toma de decisiones para beneficio de todos estos rubros. Una de las mayores preocupaciones es la resistencia a los antibióticos tanto en bacterias zoonóticas y patógenas en humanos, que, si bien no es un problema nuevo, en los últimos años ha aumentado de manera desmedida. Se estima que la resistencia a los antibióticos causa aproximadamente 700 mil muertes anuales a nivel mundial, y en caso de seguir la misma tendencia en aumento como hasta ahora, esta cantidad podría ascender a 10 millones de personas para el año 2050 (Pons et al., 2020).

El monitoreo de la resistencia a los antibióticos en bacterias como *Salmonella*, es de interés para el enfoque Una Salud, debido a que este es un patógeno que afecta

la salud de humanos, animales domésticos, fauna silvestre y el entorno en que cohabitan (Gal-Mor, 2019; McEwen & Collignon, 2018).

2.2 Resistencia a los antibióticos.

La resistencia a los antibióticos, se refiere a la habilidad de una bacteria para subsistir a la presencia de un antibiótico que a ciertas concentraciones inactivarían a otras de la misma especie (Alós, 2015). Los antibióticos realizan una interacción o alteración de algún objetivo específico esencial para la vida de la bacteria (Wright, 2010). La resistencia ocurre cuando alguno de estos mecanismos ya no tiene este efecto sobre la bacteria. A grandes rasgos podemos englobar los diferentes mecanismos de resistencia a los antibióticos en: bombas de eflujo, inactivación del antibiótico mediado por enzimas, inmunidad adquirida por competencia de receptores y cambio en la conformación del sitio de acción mediado por enzimas (Reygaert, 2018).

Las bombas de eflujo son capaces de expulsar del interior de la bacteria al antibiótico presente, evitando que este llegue a una concentración letal para sí misma (Blanco et al., 2016). Aunque estas bombas de eflujo no signifiquen siempre resistencia a los antibióticos, su asociación con otros mecanismos puede aumentarla considerablemente (Türkel et al., 2018). La inactivación de antibióticos por enzimas se lleva a cabo principalmente por tres tipos: las β -lactamasas, las enzimas modificadoras de aminoglucósidos y las cloranfenicol-acetiltransferasas (Kapoor et al., 2017). Estas pueden degradar al antibiótico por hidrólisis o transfiriendo algún grupo químico a la droga por medio de acetilación, fosforilación o adenilación, perdiendo así su capacidad antibiótica (Reygaert, 2018). La inmunidad adquirida por competencia de receptores hace referencia a la producción de proteínas que se unen al sitio de acción de los antibióticos, evitando el enlace de estas drogas al sitio de acción lo que lleva a la resistencia (Yu et al., 2020). Por último, la resistencia puede darse por la acción de una enzima que modifique el sitio

de acción del antibiótico, por la adición de grupos químicos, y al ser la interacción tan específica, cualquier modificación en el sitio de acción evita la unión a él, dando como resultado la resistencia (Yu et al., 2020).

La presencia de estos mecanismos de resistencia, toman importancia al encontrarse cada vez más presentes en especies de relevancia clínica, que limitan las posibilidades de un tratamiento eficaz. A pesar de que muchos de estos mecanismos pueden ser inherentes en algunos géneros bacterianos, la transferencia horizontal de éstos da la posibilidad de un esparcimiento y diseminación de genes entre otros géneros (Lerminiaux & Cameron, 2019).

2.3 La colistina

La colistina (o polimixina E) pertenece a la familia de las polimixinas, esta fue aislada en 1947 por Koyama y colaboradores a partir *P. polymyxa* subsp. *Colistinus*. Su uso en clínica se detuvo alrededor de los años 70s por su neurotoxicidad y hepatotoxicidad (Aghapour et al., 2019; Garza-Ramos et al., 2018). Durante los últimos años, este antibiótico ha tomado gran importancia debido a que es en muchas ocasiones la última opción farmacológica ante el combate de bacterias MRA, incluyendo la resistencia al carbapenem (El-Sayed et al., 2020). La acción antimicrobiana de la colistina puede ser atribuida a su estructura química observada en la Figura 1, la cual está formada por una un polipeptido de 10 aminoácidos, que se ciclan entre el aminoácido 4 y 10, al cual se una cadena tripeptídica acilada en su N terminal con una cola de ácido graso (Bialvaei & Samadi-Kafil, 2015).

La colistina, ante las bacterias Gram-negativas actúa sobre su membrana, que se encuentra estructurada por una cara interna de naturaleza fosfolipídica y una cara externa de LPS (Gonzalez-Avila et al., 2021).

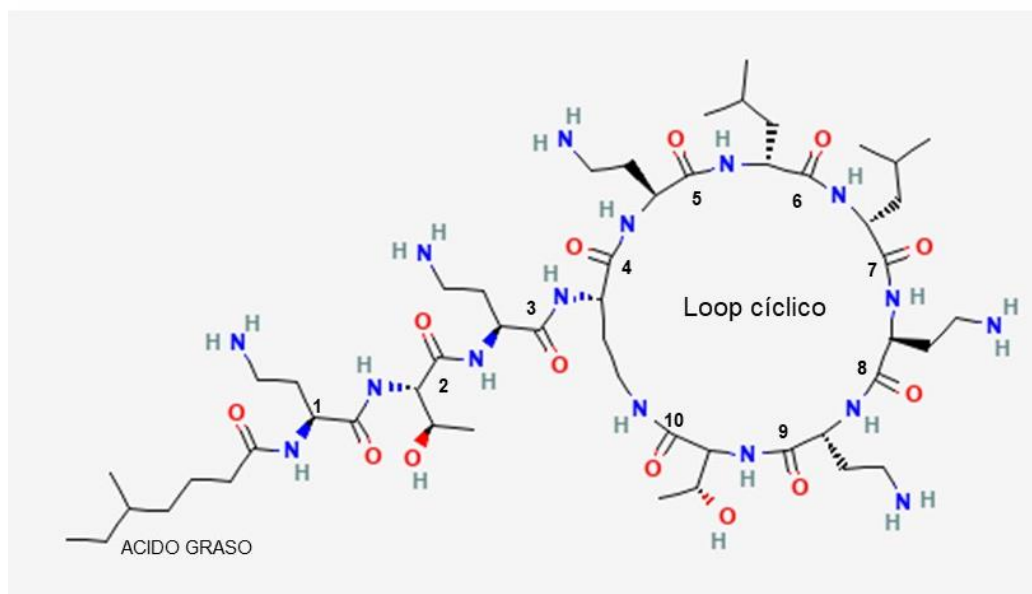


Figura 1. Estructura básica de la colistina. Aminoácidos 1, 3, 4, 5, 8, 9: ácido diaminobutírico; 2, 10: L-treonina; 6, 7 D-leucina. Se aprecia un ciclo entre los aminoácidos en la posición 4-10. Se unen en cadena de tres aminoácidos en la posición 1 a un ácido graso. Fuente: tomado y modificado de Gonzalez-Avila et al., 2021

El mecanismo exacto por el cual la colistina tiene un efecto antimicrobiano es aún desconocido, pero este se atribuye a la interacción entre la molécula catiónica de la colistina y los LPS aniónicos presentes en la membrana externa. Estos LPS tienen entre sus funciones limitar la penetración de moléculas hidrofóbicas, la entrada de antibióticos de cadena larga, y proporcionar integridad y estabilidad a la membrana externa (Bialvaei & Samadi-Kafil, 2015).

Los LPS de la parte externa de las Gram-negativas se componen de tres dominios estructurales principales: El antígeno O, el lípido A y un núcleo de polisacáridos (Bertani & Ruiz, 2018). La colistina, como se observa en la Figura 2 actúa por un mecanismo de dos pasos: 1) El anillo cargado positivamente interactúa con el lípido A, cargado negativamente provocando el desplazamiento competitivo de los iones calcio y magnesio presentes en los grupos fosfatos del LPS, y cuya función es brindar estabilidad a estos, 2) lo que lleva a la ruptura de la membrana y por lo tanto la muerte de la bacteria (Bialvaei & Samadi-Kafil, 2015).

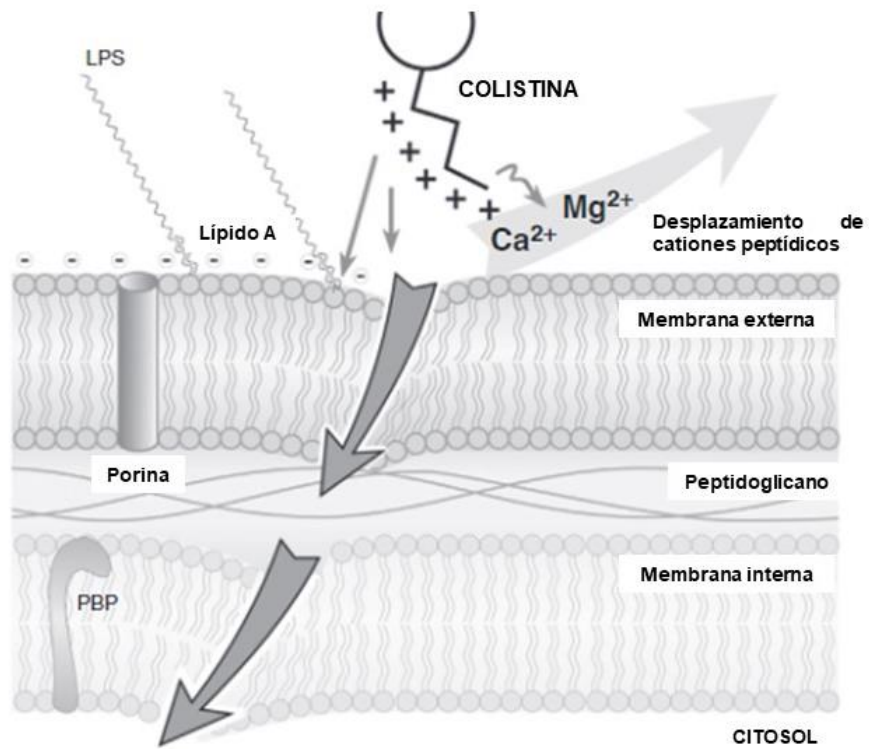


Figura 2. Acción de la colistina sobre la membrana bacteriana externa. La molécula cargada positivamente interactúa con la carga negativa de los lipopolisacáridos de la membrana, provocando el desplazamiento repulsivo de los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} y la desestabilización de la membrana, y por consiguiente lisis. Tomado y modificado de Bialvaei & Samadi-Kafil, 2015.

2.3.1 Resistencia a la colistina

La resistencia a la colistina entre los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* pudiera ocurrir por distintos mecanismos como los observados en la Figura 3. De manera intrínseca, en bacterias Gram-negativas como *Neisseria meningitidis*, *Proteus mirabilis* y *Burkholderia* spp., la activación de mecanismos codificados cromosómicamente le permiten la adición de grupos químicos cargados positivamente como la 4-amino-L-arabinosa, fosfoetanolamina y/o galactosamina a los LPS de la membrana reduciendo así la carga negativa y por consiguiente, evitando que la colistina ejerza su acción antimicrobiana (Moffatt et al., 2019). Además, la resistencia intrínseca a la colistina se ha observado por la sobreexpresión del sistema de bombas de eflujo, la sobreproducción de cápsula de polisacáridos y únicamente en *P. polymyxa*, se ha reportado producción de colistinasa (Aghapour et al., 2019).

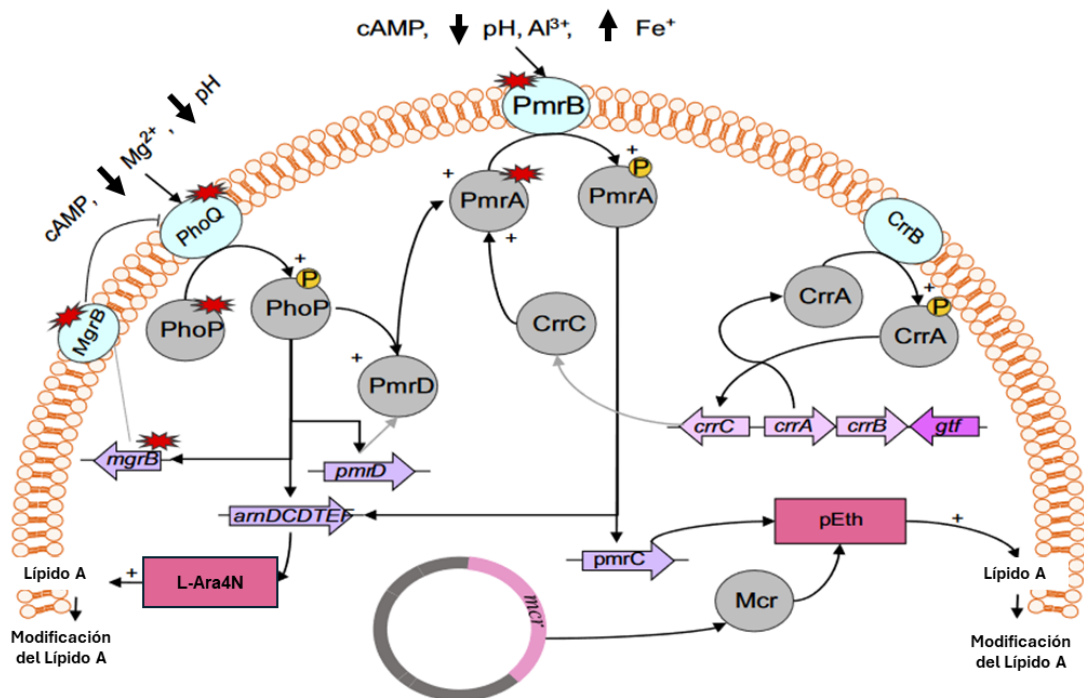


Figura 3. Diferentes mecanismos moleculares relacionados con la resistencia a la colistina en *Enterobacteriaceae*. Tomado y modificado de Aghapour et al., 2019

La mutación de genes asociados a los sistemas reguladores de dos componentes como *prmAB*, *phoPQ*, *mgrB*, y *crrAB*, se transfieren de manera vertical entre miembros de la misma especie y se creía hasta hace poco que estas mutaciones podrían ser las únicas causantes de resistencia a la colistina (Anyanwu et al., 2021).

En el año 2016, se reportó por primera vez un gen de transmisión horizontal, a través de plásmidos denominado *mcr*, el cual codificaba una enzima perteneciente a la familia de las fosfoetanolamina transferasas, con acción de añadir una molécula de fosfoetanolamina al lípido A del LPS, evitando así la interacción con la colistina y, por lo tanto, causando resistencia a ella (Liu et al., 2016). Este gen se ha detectado hasta el año 2020 en 60 países alrededor de seis continentes, mostrando su rápida diseminación. Lo que ha alarmado a los organismos de salud pública alrededor del mundo (Anyanwu et al., 2021).

2.3.2 Genes *mcr* (mobile colistin resistance)

Los genes *mcr* fueron identificados por primera vez en 2016 por Liu y colaboradores, en cepas de *E. coli* resistentes a la colistina provenientes de carne de pollo y muestras humanas. Este gen denominado *mcr-1*, encontrado en un plásmido de tipo IncI2, mostró la capacidad de transcribir una enzima relacionada estructuralmente con la familia de las fosfoetanolaminas transferasas (Liu et al., 2016). Estas enzimas se caracterizan por su capacidad para unir una molécula de fosfoetanolamina al lípido A del LPS presente en la membrana externa de las Gram-negativas, reduciendo la carga negativa de estos, la cual es necesaria para la acción de la colistina (Anyanwu et al., 2021).

Desde su reporte en 2016, se han reportado 10 diferentes variantes de *mcr*: *mcr-1*, *mcr-2* (Xavier et al., 2016), *mcr-3* (Yin et al., 2017), *mcr-4* (Carattoli et al., 2017), *mcr-5* (Borowiak et al., 2017), *mcr-6*, *mcr-7* (Yang et al., 2018), *mcr-8* (Wang et al., 2018), *mcr-9* (Carroll et al., 2019) y *mcr-10* (Wang et al., 2020). Las cuales toman a *mcr-1* como la secuencia original y son asignadas basadas en la identidad de la

secuencia de aminoácidos, en lugar de la secuencia de nucleótidos (Partridge et al., 2018).

El análisis informático de las secuencias de aminoácidos de las proteínas codificadas por los *mcr* propone al menos tres diferentes orígenes evolucionarios de las diferentes variantes existentes de este gen y la proteína MCR que codifican. La primera, se propone que pudiera contener a *mcr-1*, *mcr-2*, y *mcr-6*, que se cree provienen del mismo ancestro, *Moraxella* spp. El siguiente origen evolutivo apunta hacia *Aeromonas* spp. que incluiría a *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-7* y *mcr-9*. El tercer camino evolutivo, contendría a *mcr-5* y sus variantes (Ling et al., 2020). El último *mcr* reportando, *mcr-10* podría provenir de especies de *Buttiauxella*, ya que la secuencia proteína es muy similar a otras fosfoetanolaminas transferasas encontradas cromosómicamente en estas especies (Wang et al., 2020).

2.4 *Salmonella enterica*

2.4.1 Características de *Salmonella enterica*

Salmonella es un género de bacterias móviles por medio de flagelos peritricos, Gram-negativas y anaerobias facultativas que forman parte de la familia *Enterobacteriaceae*, su clasificación taxonómica puede observarse en la Tabla 1 (Liu et al., 2021; Parte et al., 2020) Éstas miden aproximadamente de 2 - 5 µm de largo por 0.5 - 1.5 µm de ancho. El tamaño de su genoma varía entre los distintos serovares, que va desde 4460 a 4857 kb, conformado en un sólo cromosoma circular más un plásmido de virulencia como pSLT, presente únicamente en *S. enterica* subespecie *enterica* (Andino & Hanning, 2015; Knodler & Elfenbein, 2019). La clasificación de *Salmonella* puede dividirla en dos grandes especies y seis subespecies que incluyen a más de 2,579 serovares. Las dos especies más reconocidas en el género *Salmonella* son *S. bongori* y *S. enterica*. Las características bioquímicas de *Salmonella* presentan la fermentación de lactosa,

producción de sulfuro de hidrógeno, oxidasa negativa y catalasa positiva. Otras características bioquímicas que facilitan la identificación de *Salmonella* son su capacidad para crecer en citrato, su poder de descarboxilar la lisina y de hidrolizar la urea. Además de ser negativa para la oxidasa y positiva para la catalasa, junto con la producción de hidrógeno (Andino & Hanning, 2015).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de acuerdo con la secuenciación del gen 16S rRNA de *Salmonella enterica*.*

Dominio	<i>Bacteria</i>
Filo	<i>Proteobacteria</i>
Clase	<i>Gammaproteobacteria</i>
Orden	<i>Enterobacterales</i>
Familia	<i>Enterobacteriaceae</i>
Género	<i>Salmonella</i>
Especie	<i>Salmonella enterica</i>

*Fuente: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN, consultado el 24 de febrero 2022. Parte et al., 2020)

Salmonella enterica puede encontrarse en parte como reservorio natural en aves de corral, ganado, reptiles y cerdos. Al estar *S. enterica* estrechamente relacionada con los productos frescos derivados de estos animales, el medio principal por el cual se adquiere la infección en humanos se debe al consumo de carne cruda o contaminada, leche, huevos, pescados u otros productos infectados (Li et al., 2016). De igual manera, esta llega a afectar a la industria animal; solamente en Estados Unidos, en la industria relacionada con la comercialización del cerdo y sus productos, se han reportado pérdidas por más de \$3.7 billones de dólares al año (Bearson, 2022).

2.4.2 Salmonelosis en humanos

La *S. enterica* es capaz de provocar una enfermedad denominada salmonelosis, que se caracteriza por presentar signos y síntomas muy parecidos a otras gastroenteritis que podrían ser fatales en población vulnerable como los niños, ancianos y personas inmunosuprimidas. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), *Salmonella* figura como una de las cuatro razones principales de enfermedades diarreicas a nivel mundial, impactando 550 millones de personas al año (OMS, 2018).

La alta prevalencia de *S. enterica* puede deberse a su presencia en animales, humanos, además de encontrarse en el medio ambiente. *S. enterica* invade el epitelio intestinal en el íleon y el colon poco después de la ingestión, causando gastroenteritis neutrofílica o diseminándose a sitios sistémicos causando sepsis. Al crecer de manera intracelular, la resistencia antimicrobiana puede darse de manera intrínseca, además de la pequeña posibilidad de una colonización crónica (Knodler & Elfenbein, 2019). Aunque la salmonelosis puede presentarse con signos y síntomas en varios grados de severidad, los casos más leves no requieren de tratamiento antibiótico, ya que la enfermedad tiene características autolimitantes. El tratamiento con diferentes tipos de antimicrobianos toma importancia principalmente cuando la infección ocurre en pacientes vulnerables. El tratamiento común para *S. enterica*, tanto en humanos como animales incluye a los antibióticos de las familias de las quinolonas, beta-lactamasas, aminociclósidos, tetraciclinas y el trimetoprim/sulfametazol (Gargano et al., 2021).

Diferentes estudios epidemiológicos han demostrado la presencia cada vez mayor de cepas de *S. enterica* MRA, con perfiles de resistencia que involucran a las cefalosporinas, quinolonas, tetraciclinas, ampicilinas y sulfonamidas en diferentes grados (Parry & Threlfall, 2008). La detección oportuna de la salmonelosis, así como conocer su perfil de resistencia puede ser de gran importancia, mejorando así el pronóstico del paciente.

2.4.3 Genes *mcr* en *Salmonella enterica*

Desde el primer reporte del gen *mcr* encontrado en un plásmido transmisible horizontalmente en *E. coli* en el año 2016, la búsqueda y monitoreo de su diseminación alrededor del mundo, especialmente entre los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, tanto en estudios retrospectivos, como actuales ha ido incrementando debido a la presencia cada vez mayor de cepas MRA (Ling et al., 2020).

Hoy en día, existe preocupación de la diseminación de *mcr* entre el género *Salmonella*, un importante patógeno zoonótico, con potencial de causar infecciones en humanos a través de la cadena alimenticia. Si bien, el uso de colistina no es común en el tratamiento de *Salmonella*, la resistencia de los antibióticos de primera elección como cloranfenicol, trimetoprima/sulfametazol, ampicilina, y amoxicilina ha llevado al uso de alternativas como fluoroquinolonas y cefalosporinas de amplio espectro como la ceftriaxona, pero también han mostrado resistencia (Lima et al., 2019).

No obstante, la preocupación principal de la presencia de genes *mcr* en *Salmonella*, es la posibilidad de su diseminación horizontal a otros géneros entre la familia *Enterobacteriaceae* (Lima et al., 2019). Hasta el día de hoy, los reportes de diferentes clases de *mcr* en *Salmonella* ha aumentado, siendo las más detectadas: *mcr-1* (Li et al., 2016), *mcr-2* (Garcia-Graells et al., 2018), *mcr-3* (Yin et al., 2017), *mcr-4* (Carattoli et al., 2017), *mcr-5* (Borowiak et al., 2017) y *mcr-9* (Carroll et al., 2019).

Si bien es cierto que la mayoría de los aislamientos de *Salmonella* con presencia del gen *mcr* son provenientes de la industria animal, su detección en muestras clínicas humanas también se ha reportado. En Estados Unidos, *mcr-3* fue detectado en una muestra de coprológicas humanas, proveniente de un paciente con gastroenteritis (Yin et al., 2017). En el mismo país, *mcr-9* fue detectado de una muestra de sangre humana en una cepa de *S. enterica* serotipo Heidelberg

(Abdullah et al., 2021). De la misma manera, en China, en la provincia de Juangsu se aislaron 8 cepas de pacientes con gastroenteritis, positivos al gen *mcr-1* (Liu et al., 2021). En Europa, el análisis retrospectivo *in silico* de secuencias de *Salmonella* provenientes de muestras clínicas humanas, detectó *mcr-1* en 10 aislamientos obtenidos entre el año 2012-2015 (Doumith et al., 2016). Adicionalmente, Italia ha sido uno de los países con mayor reporte de aislamientos positivos a genes *mcr*. En el año 2016, un estudio de la búsqueda del gen *mcr-1* y *mcr-2* en *Salmonella* proveniente de diferentes fuentes, mostró la presencia de *mcr-1* en 10 muestras clínicas humanas, y ningún aislamiento de *mcr-2* (Carnevali et al., 2016). Este mismo país, reportó el gen *mcr-4* y una nueva variante, *mcr-4.2* en dos pacientes con gastroenteritis (Carretto et al., 2018).

Una de las más recientes variantes de *mcr-3*, fue reportada en Canadá, en una muestra fecal humana aislada en 2013, de un paciente con antecedentes previos de viaje al continente asiático, la cual se denominó *mcr-3.2* (Mulvey et al., 2018). La detección de *Salmonella* con genes *mcr*, en pacientes con viajes al continente asiático no es un acontecimiento aislado. Dinamarca reportó 10 cepas de *Salmonella* de muestras clínicas con genes *mcr-3* de las cuales 4 tenían historias de viaje a Asia (Littrup et al., 2017). El gen *mcr-1* es el más reportado en *Salmonella* en muestras clínicas en diferentes países, como Portugal (Campos et al., 2016), Suiza (Carroll et al., 2018), Colombia (Saavedra et al., 2017).

2.5 Métodos de detección de resistencia a los antibióticos.

Actualmente existen distintos métodos para evaluar la resistencia a los antibióticos, estos ensayos son fundamentales para elegir la mejor estrategia terapéutica para combatir al patógeno, así como minimizar el uso indiscriminado de antibióticos (Idelevich & Becker, 2019; Trinh & Lee, 2021)

Uno de los métodos microbiológicos para evaluar la resistencia a antibióticos son los ensayos de difusión a través de un disco, aplicando previamente inóculo bacteriano con un isopo estéril a toda una superficie de agar MH, para luego colocar

en la superficie del agar, discos de papel filtro con antibiótico preparados comercialmente a concentraciones conocidas (Idelevich & Becker, 2019). La interpretación se basa en el tamaño del halo de inhibición alrededor de cada disco, que, dependiendo el antibiótico, se clasifica como sensible, resistente o intermedio (Reller et al., 2009). Otros métodos por difusión pueden incluir el método por de tiras Epsilon, que permite conocer de una manera visual la CMI a comparación de su variante por disco (Jiménez-Pearson et al., 2019). Además de estos, en los últimos años, los estudios de resistencia a antibióticos mediante métodos de macro y micro dilución han cobrado gran importancia, ya sea utilizando agar o caldo de cultivo (Lowman, 2018). Para llevar a cabo estos ensayos se incorpora el antibiótico directamente en el medio de cultivo en concentraciones conocidas permitiendo una determinación cuantitativa, que podría interpolarse de una mejor manera a la práctica clínica para una terapia más efectiva (Kowalska-Krochmal & Dudek-Wicher, 2021).

Las ventajas que tienen los métodos cultivo-dependientes podrían atribuirse a un costo bajo relativo y poca capacitación necesaria para realizarlos, pero el tiempo de obtención de resultados sigue siendo la mayor limitante de estos ensayos (Kowalska-Krochmal & Dudek-Wicher, 2021), ya que junto a la identificación del microorganismo, el resultado podría tomar de 7 a 10 días, retrasando la terapia efectiva, dado el requerimiento de medios selectivos, caracterización de colonias sospechosas mediante pruebas bioquímicas, además de la serotipificación. Tal cantidad de manipulación también aumenta el riesgo de contaminación y laboriosidad cuando se trata de un alto número de muestras, además de la dificultad de cultivo en bacterias con crecimiento fastidioso (Ratto-Tespestini et al., 2016; Sahu et al., 2019)

Para sobrepasar las limitaciones de las técnicas cultivo-dependientes, los métodos moleculares han tenido un auge importante. Entre estos métodos destacan la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y sus variantes en tiempo real (qPCR) y PCR multiplex, de igual manera el MALDI-TOF MS, la secuenciación del genoma

completo y microarreglos, que muestran mejor sensibilidad y especificidad, así como tiempos más cortos para la obtención de resultados (Wolff et al., 2021). Aunque en principio, el costo de las técnicas moleculares podría ser su mayor barrera de entrada a la práctica clínica, se ha demostrado que la relación costo-beneficio que proporcionan resultados rápidos en la clínica, permiten la administración oportuna de la terapia adecuada, reduciendo así la mortalidad y los tiempos de estancia hospitalaria (Pliakos et al., 2018). De los métodos moleculares antes mencionados, es la PCR y sus variantes, las que han sido más adoptadas dentro de la práctica clínica, principalmente por su rapidez y alta sensibilidad que permite tomar decisiones sobre el paciente, para evitar la administración empírica de antibióticos mientras se espera conocer el perfil completo de resistencia mediante las técnicas cultivo-dependientes (Martín-Peña et al., 2013).

La detección de los genes asociados a la resistencia a los antibióticos fuera de la práctica clínica ha demostrado ser importante para la toma de decisiones epidemiológicas, dada su frecuente asociación con elementos genéticos móviles como plásmidos, integrones y elementos transponibles, que ayudan y facilitan su difusión. Para este fin, un método molecular muy empleado es la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa, por sus siglas en inglés), el cual que permite la replicación enzimática del ADN, sin el uso de un microorganismo vivo, amplificando la cadena de ADN durante varios ciclos de manera exponencial. La PCR es llevada a cabo en pequeños tubos de reacción en volúmenes bajos, dentro de un termociclador que oscila en diferentes temperaturas dando las condiciones adecuadas para que ocurra la amplificación de una región específica del ADN (Rahman et al., 2013). Para que la replicación pueda ocurrir de manera in vitro, esta requiere la presencia de ciertos componentes como: un templado de ADN, que servirá como molde, desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) como adenina, timina, guanina y citosina, una Taq polimerasa capaz de elongar el ADN integrando a la cadena los dNTPs a altas temperaturas, oligonucleótidos cebadores que se unan complementariamente a una

región específica del ADN a replicar, y un buffer que permita el medio óptimo iónico y de pH para que la reacción pueda ocurrir (Waters & Shapter, 2014).

Una parte crítica en cualquier ensayo de PCR es el análisis y diseño de la secuencia de oligonucléotidos que flanquearan la región a amplificar, los cuales debe unirse específicamente con una región blanco, permitiendo a la Taq polimerasa unirse y comenzar el proceso de polimerización. Durante el diseño de estos iniciadores, deben cuidarse ciertos parámetros con el fin de evitar que estos puedan hibridarse de forma no específica con secuencias que son similares, pero no completamente idénticas, al ADN diana. Así como evitar la hibridación entre ellos mismos (Garibyan & Avashia, 2013). Una de las variantes de los ensayos de PCR, que ha cobrado importancia es la PCR multiplex, que permite la amplificación de dos o más secuencias de ADN, permitiendo reducir el tiempo de respuesta para obtener resultados precisos; reducción en el consumo de reactivos, la identificación de coinfecciones; además de mostrar una alta sensibilidad y especificidad que ofrece la mayoría de las pruebas moleculares (Zhang et al., 2015). Una de las desventajas que podrían mencionarse sobre la PCR, es la fácil contaminación de la muestra dada lo sensible que es la prueba. Además de la complejidad para el diseñar adecuadamente los iniciadores de la PCR, la necesidad de datos de secuencia previos, pudiendo identificar la presencia o ausencia de un patógeno o gen conocido, la hibridación de los iniciadores de forma no específica y la posibilidad de incorporación de nucleótidos incorrectos por parte de la ADN polimerasa (Garibyan & Avashia, 2013).

El método de PCR para la detección de resistencia antibacteriana actualmente se utiliza en la industria de alimentos con el fin de salvaguardar la seguridad alimentaria (Vandeweyer et al., 2019), tanto en la agricultura (McLain et al., 2016), como en la producción animal (Jribi et al., 2020). El éxito de un ensayo de PCR dependerá del correcto análisis del gen que se busca amplificar, los iniciadores específicos para la secuencia blanco, así como la estandarización de los diferentes pasos del ensayo (Canene-Adams, 2013).

3 Objetivos

3.1 General

Desarrollar y estandarizar un ensayo de PCR multiplex para detectar la prevalencia y diversidad del gen *mcr*, que confiere resistencia a colistina en aislamientos de *Salmonella enterica*.

3.2 Particulares

1. Analizar los diferentes alelos del gen *mcr* y seleccionar iniciadores de PCR para efectiva detección.
2. Diseñar y validar un ensayo de PCR multiplex capaz de caracterizar la diversidad de del gen *mcr* en *S. enterica*.
3. Evaluar la resistencia a la colistina a través de ensayos fenotípicos de microdilución en caldo en aislamientos de *S. enterica*.

3.3 Profesionalizantes

1. Obtener conocimiento acerca de técnicas de detección molecular
2. Adquirir capacidad para la transferencia e implementación de técnicas moleculares.
3. Conocer la importancia de la participación del profesional de salud en el análisis de las variantes génicas de resistencia.
4. Desarrollar la comunicación oral y escrita en reportes científicos.
5. Trabajar interdisciplinariamente durante el desarrollo del proyecto

4 Metodología

4.1 Diseño

El diseño de este proyecto de investigación es de tipo transversal retrospectivo y descriptivo.

4.1.1 Definición del Universo

Aislamientos de *Salmonella enterica* obtenidos de productos cárnicos avícolas del año 2016.

4.1.2 Tamaño de muestra

Cepario conformado por 88 aislamientos de *Salmonella enterica* del periodo 2016 pertenecientes al programa de monitoreo permanente de *Salmonella* con potencial zoonótico del Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

4.1.3 Definición de las unidades de observación

De acuerdo con la Tabla 2, se define el grupo a evaluar.

Tabla 2. Definición de las unidades de observación.

Unidades de observación	Definición	Unidad de medida
<i>Salmonella enterica</i>	Bacteria Gram-negativa de la familia <i>Enterobacteriaceae</i> , caracterizadas molecularmente por la amplificación del gen <i>InvA</i> y el <i>16S rRNA</i> (MINf-MINr)	Presencia o ausencia del gen <i>mcr</i>

4.1.4 Criterios de inclusión

- a) Cepas de *S. enterica* del periodo enero-diciembre 2016 pertenecientes al programa de monitoreo permanente de *Salmonella* con potencial zoonótico del Laboratorio de Microbiología Molecular.

4.1.5 Criterios de exclusión

- a) Cepas aisladas fuera del periodo enero - diciembre 2016.

4.1.6 Criterios de eliminación

- a) Cepas con problemas de reactivación o contaminación.

4.1.7 Definición de variables y unidades de medida

Tabla 3. Características de la variable

Variable	Definición	Unidad de medida	Tipo de variable
Genes <i>mcr</i>	<i>mcr-1</i>	Presente o ausente	Cualitativa nominal
	<i>mcr-2</i>	Presente o ausente	Cualitativa nominal
	<i>mcr-3</i>	Presente o ausente	Cualitativa nominal
	<i>mcr-4</i>	Presente o ausente	Cualitativa nominal
	<i>mcr-5</i>	Presente o ausente	Cualitativa nominal
	<i>mcr-9</i>	Presente o ausente	Cualitativa nominal

4.2 Materiales

4.2.1 Equipo

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

4.2.2 Medios de cultivo.

- Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD).

- Caldo Soya tripticaseína (Acumedia, Neogen).
- Agar Soya Tripticaseína (BD, Bioxon)
- Agar Bacteriológico (Tipo europeo), No. 2 (Neogen)
- Caldo Mueller Hinton 2 (Millipore, Sigma Aldrich)

4.2.3 Soluciones.

- Agarosa 1.5%
- Solución salina isotónica (SSI) 0.85%
- ZymoBIOMICSTM DNA Mini Kit (Zymo Research)

4.2.4 Reactivos

- Bromuro de etidio (10mg/mL)
- Kit de Extracción de ADN (Quick- gDNA Zymo Research®)
- Reactivos para PCR: H₂O, 10X taq Buffer, dNTP.

Enzimas comerciales para realizar la PCR:

- ADN polimerasa Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific™)

4.2.5 Material biológico

Las 88 cepas de *Salmonella enterica* del periodo 2016 pertenecientes al programa de monitoreo permanente de *Salmonella* con potencial zoonótico del Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, provenientes de más de 700 muestras de animales en producción y productos cárnicos en México. Las muestras se encuentran preservadas en glicerol al 20% a -20°C en congelación.

4.3 Métodos

4.3.1 Análisis de los diferentes alelos del gen *mcr* y selección de iniciadores de PCR para su efectiva detección.

Con la finalidad de identificar los genes *mcr* asociados a resistencia a la colistina, se analizaron exhaustivamente en la literatura las variantes de este gen reportadas hasta el momento en el género *Salmonella* (Tabla 4).

Tabla 4. Genes *mcr* que codifican para proteínas fosfoetanolamina transferasas que confieren resistencia a la colistina que se han reportado en *Salmonella* spp.

Gen	Nucleótido*	Proteína*	Referencia
<i>mcr-1</i>	KP347127	AKF16168	(Liu et al., 2016)
<i>mcr-2</i>	LT598652	SBV31106	(Xavier et al., 2016)
<i>mcr-3</i>	KY924928.1	ASF81896.1	(Yin et al., 2017)
<i>mcr-4</i>	MF543359.1	ASR73329.1	(Carattoli et al., 2017)
<i>mcr-5</i>	KY807920.1	ASK40551.1	(Borowiak et al., 2017)
<i>mcr-9</i>	NC_021819.1	WP_001572373.1	(Carroll et al., 2019)

*Número de acceso en el GenBank

Una vez identificados los genes *mcr* reportados en *Salmonella*, se utilizó la base de datos integral de resistencia a los antibióticos CARD, disponible en <https://card.mcmaster.ca/home> (Alcock et al., 2020), para obtener las secuencias de nucleótidos y proteínas de todas las variantes alélicas de los distintos genes *mcr* en formato FASTA permitiendo la comparación y análisis de secuencias haciendo uso de la herramienta bioinformática MUSCLE (Madeira et al., 2019), con el fin de identificar los porcentajes de identidad entre las variantes. Las secuencias obtenidas fueron utilizadas para reafirmar la información de la literatura con secuencias de plásmidos de *Salmonella* depositados en GenBank.

A partir de este ejercicio, se realizó una exhaustiva búsqueda de iniciadores de PCR utilizados y estandarizados para la detección de genes *mcr* en miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Estos iniciadores de PCR fueron analizados mediante el uso de diferentes herramientas bioinformáticas, como Multiple Primer Analyzer de Thermo Scientific Web Tools e In silico PCR amplification version 1.0 (2003) por Joseba Bikandi y PrimerList de Primer Digital (Kalendar, 2022). De toda la información recopilada, se seleccionaron los pares de iniciadores que se identificaron con las condiciones adecuadas para establecer el ensayo multiplex de PCR; T_M ($^{\circ}\text{C}$), contenido de GC, longitud de los iniciadores, número de bases individuales, coeficiente de extinción ($l/(\text{mol}\cdot\text{cm})$), peso molecular (g/mol) cantidad/unidad OD (nmol/OD_{260}), masa ($\mu\text{g/OD}_{260}$), estimación de iniciador-dímero, además de verificar los tamaños del amplicón, buscando un aproximado a 200 pb de diferencia, con el fin de evitar observar solapamientos de bandas en el gel de agarosa (Borowiak et al., 2020; Rebelo et al., 2018). Se utilizaron las secuencias representativas de cada gen previamente obtenidas para realizar los ensayos de eficiencia, para obtener el mayor número de aciertos (secuencias detectadas) entre el total de secuencias objetivos existentes en la base de datos recabada. El listado de iniciadores seleccionados puede observarse en la Tabla 5.

4.3.2 Diseño y validación de la PCR multiplex capaz de caracterizar la diversidad del gen de *mcr* en *S. enterica*

4.3.2.1 Diseño de control positivo para la detección de las variantes del gen *mcr*

Dos Controles Internos de Amplificación (CIA), que contenía secuencias objetivo de los genes *mcr* fueron ordenados a Integrated DNA Technologies, BVBA (Lovaina, Bélgica) para ser utilizados como control positivo de detección del gen *mcr*. Los CIA, nombrados CONTROL-1 y CONTROL-2 se diseñaron con un tamaño total de 995 pb Figura 4. Los CIA se resuspendieron en agua libre de nucleasas a una

concentración de 10 ng/μL. Después de las optimizaciones, se utilizó la dilución a concentración 1 ng/μL como material de trabajo.

La amplificación del CONTROL-1 y CONTROL-2 se estandarizaron con las siguientes condiciones de amplificación: 94 °C durante 2 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 30 s, 59 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s, con un paso de extensión final de 72 °C durante 2 min, utilizando como iniciadores *mcr-9f*: GGTGAAAGTTATTCCGCTGG y *mcr-9r*: TCGCGGTCAGGATTATAGAC para la amplificación del CONTROL-2 y *mcr5-f*: ATGCGGTTGTCTGCATTTATC y *mcr5-r*: TCATTGTGGTTGCCTTTTCT, para el CONTROL-1.

```

MCR-CONTROL1/1-995 1 ATGCGGTTGCTGCAATTTATCTATGCTCAAGCCCTTCTTTTTCTGTA AAAACCGCCAGAGCACAGAATTAAGCAG 72
MCR-CONTROL2/1-995 1 GGTGAAAGTTATTCCGCTGGTGGGACCGGACTCCCTAACCTTCGGGGATGGCGGCTATCCTGTATTTAGGGG 72

MCR-CONTROL1/1-995 73 AATCTAAGGACTTGATGAATTTGTATTGGGATAGTCGCCCTTTTTCTGTGTGGGACCGACGCTCGGTCAGTCC 144
MCR-CONTROL2/1-995 73 ATAAACCGACCCTGATTTGTCAGACGCCCATGGAAATACCTTATAAAAATAAAAAATTAAGTCCGTTTGTCTT 144

MCR-CONTROL1/1-995 145 GTTTGTTCTTGTGGCGAGTGTTCGCCCTTTCTTGACCGCGACCCCAATCTTACCTTTTTGATAAAATCAG 216
MCR-CONTROL2/1-995 145 GTGGCGCATTTTATTTCGCCCTTAATGCTGAACCTGGCGTGGAGTTCTCCGATTTTACGAAATCCTTTACAAAT 216

MCR-CONTROL1/1-995 217 CCGTATCCTTCCTGCCATCCTCAATCTCGGCTTTGTGCTGACGATCGCTGTGGTCCGTCGGTCAATCCCTA 288
MCR-CONTROL2/1-995 217 TAGAAGATTTAAGTTTGGTTTTCGCCATTTTCATTACCAATATTGCTTGTGGCAGCGCTTACCGATAC TAGCT 288

MCR-CONTROL1/1-995 289 TCTGTTCCACCACGCTGTTATCATCGTATCGCTATGCTGCTAAAGCCTGTGTTGATTTGCTATTAATGGCAC 360
MCR-CONTROL2/1-995 289 CATGCGGCTCGATACGGTATTTAATAAAGCCTTTTTTTGCACTTCTTATCGCACTTAGTGCAATCGTTAGTA 360

MCR-CONTROL1/1-995 361 TG TATTTCGCGTTTCATTTTACTGACACTTATGGCACGGTCTATGATAGGACCATGCTCCAAAATGCCCTACA 432
MCR-CONTROL2/1-995 361 CCAGTAAATCTGGTGGCGTAGTGGTGC CCAACATCGAGATCATATGACATGGGGTGCAGCCTTTCAAACAA 432

MCR-CONTROL1/1-995 433 GACCGACCAAGCCGAGACCAAGGATCTATTAAACCGCAGCGTTTATCATGCGTATCATTGGTTTTGGGTGTGCT 504
MCR-CONTROL2/1-995 433 GCCGAGACCAAGGATCTAGCTTACCAATTATAGTATGGGTTACTATTGCTGGTTTTATCCCTGCCATTTTAC 504

MCR-CONTROL1/1-995 505 ACCAAGTTTGTCTTGTGGCTTTTGTAAAGTGGATTATCCGACTTGGGGCAAGGGTTTGTGATAATGATTCTG 576
MCR-CONTROL2/1-995 505 TTTCTTTGTTGAAATGAATATGAGGAAAAATGGTTCAAAGGATTCTAAGTGGTCCCTATCGATGTTTGT 576

MCR-CONTROL1/1-995 577 GCTGTAAGTGGCAAGTCTTGGCGTGATTTTACTGCCGTGGTCAAGATGACTATGATGTCGATACCGCTTCTTT 648
MCR-CONTROL2/1-995 577 CATCACTTATAGTATTGCGGTTATGCAAGCACTCGTGTCTCGTACTGGTTGTAGTGGTGTCTATGACGAGG 648

MCR-CONTROL1/1-995 649 TCGCGTGCCATAAGCCGCTGCGTAGCTATGTCAATCCGATCATGCCATGGAGAAATCGCTGGGGGAATGGCCAG 720
MCR-CONTROL2/1-995 649 TTGTCTCCTCCGGGATGCGTGACGTTGCAATTTAGTTAATAGTACCGTTAAATACGTTTACAATCGTTATC 720

MCR-CONTROL1/1-995 721 TATTGAGTAAAAAAGCCAGTGGCCAAAAGATACCATTTATCACGCCAGTGTCTCGCTGTTATGGAAAAGA 792
MCR-CONTROL2/1-995 721 TTGCTGAACCAATCCCATTTACAACCTTAGGATGATGCAAAACGGGATACATAATCAAAGTAAAGCCACGT 792

MCR-CONTROL1/1-995 793 GCCTGATATGCGTAGTAGCTATGTCAATCCCGTATCGTGGTGAGACGGCACGCGCCGATCATGTCAGCTT 864
MCR-CONTROL2/1-995 793 TGATCGTCTTCATTTCGCGCAGCAACCGCTCGTGGTAAAAATTTCTCGATGAATGGCTATGAGAAAGACACCA 864

MCR-CONTROL1/1-995 865 CAATGGCTATTGTTCCAGCCAAATTTCTGTTAACACGAGGTGGCGCAGATGAAGACCAATTTAGCAATGTCAC 936
MCR-CONTROL2/1-995 865 ATCCATTTACTAGTAATTTCTGGTGGCGTATCTCCTTTAATGATGTTCTGTTGGTGGGACTGCAACCCGCTG 936

MCR-CONTROL1/1-995 937 ATCGTGGCGCACATCGACGGCGTATTCTGTGCGGTGTCAGAAAAGGACAACCACAATGA 995
MCR-CONTROL2/1-995 937 TATTCGTCGCCCTGCATTTCTCCAATATGGGGAGAAAGGAGTCTATAATCCTGACCCGGA 995

```

Figura 4. Secuencias de los controles de amplificación 1 y 2 empleadas como control positivo y sitios de alineación de los pares de iniciadores para *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5* y *mcr-9*.

4.3.2.2 Reactivación de cepas de *Salmonella*

Las cepas de *S. enterica* fueron seleccionadas y descongeladas a temperatura ambiente para proceder a la reactivación de los aislamientos. Se tomaron 100 μ L del aislamiento descongelado y atemperado para inocular en 3 mL de caldo Soya-Trypticase (ST). Se incubó a 37 °C por 24 horas.

La confirmación de identidad fenotípica de *Salmonella* se realizó tomando 10 μ L del caldo ST inoculado previamente y se depositó en Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) y se incubaron de manera invertida a 36 ± 2 °C durante 24 ± 3 h. Las colonias seleccionadas fueron aquellas con la morfología fenotípica en este tipo de agar correspondientes a *Salmonella*. Las colonias típicas de *Salmonella* en agar XLD tienen un centro negro y una zona ligeramente transparente de color rojizo debido al cambio de color del indicador (Park et al., 2012). Posteriormente, las colonias seleccionadas se inocularon por técnica de estría cruzada en agar ST y se incubaron a 24 h a 37 °C (Jajere, 2019)

4.3.2.3 Extracción de ADN.

Se inocularon 3 mL de caldo ST tomando muestra de una sola colonia previamente identificada y aislada como *Salmonella*, se incubó durante 24 h a 37 °C. Se tomó 1 mL de este caldo incubado y se sometió a extracción de ADN, utilizando el kit Quick-gDNA miniprep Zymo Research® de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Borowiak et al., 2020).

4.3.2.4 Estandarización y validación de PCR multiplex para la detección de *mcr* en *Salmonella*

Se realizaron pruebas de formación de homodímeros y heterodímeros de los iniciadores, seleccionando finalmente los mostrados en la Tabla 5 que cumplieran con los parámetros *In silico* para una PCR, además de utilizar Multiple Primer

Analizer de Thermo Scientific Web Tools. Las pruebas permitieron el diseño de 3 diferentes PCR dúplex de la siguiente manera: *mcr-2* y *mcr-3*; *mcr-9* y *mcr-1*; y *mcr-5* y *mcr-4* (Yao & Yiu, 2019).

Se estandarizaron las condiciones de PCR multiplex en diferentes concentraciones de DNA y temperaturas de alineación (Borowiak et al., 2020; Rebelo et al., 2018). Cada reacción (12 µL) de PCR consistió en 2.4 µL Phusion HF 5X Buffer (Thermo Fisher Scientific), 0.12 µL de Phusion Hot Start II DNA Polymerase (2 U/µL) (Thermo Fisher Scientific), 5.84 µL agua libre de nucleasas, 0.5 µL de cada una de las soluciones de iniciadores (10 µM), y 0.24 ul de dNTPs y 2 µL de ADN a concentración de 5 µg/µL por muestra de *Salmonella* por medición en NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Las condiciones de amplificación para los tres protocolos de PCR dúplex se estandarizaron de la siguiente manera: Desnaturalización inicial por 2 minutos a 98 °C, 10 s de desnaturalización a 98 °C, alineación de iniciadores a 30 s por 59 °C y elongación por 30 s a 72 °C, durante 35 ciclos seguido por un paso final de elongación por 2 minutos a 72 °C (Rebelo et al., 2018).

Tabla 5: Lista de iniciadores utilizados para la detección de *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-9*.

	INICIADOR	SECUENCIA (5'-3')	GEN OBJETIVO	TAMAÑO (pb)	REFERENCIA	CONDICIONES PCR
PCR-1	mcr1_320bp_fw	AGTCCGTTTGTCTTGTGGC	<i>mcr-1</i>	320	(Rebello et al., 2018)	98°C por 2 min; 98°C por 10 s; 59°C por 30 s; 72°C por 30s; 72°C 2 minutos; 35 ciclos.
	mcr1_320bp_rev	AGATCCTTGGTCTCGGCTTG				
	mcr-2-PCR F	AGCCGAGTCTAAGGACTTGATGA ATTG	<i>mcr-2</i>	576	(Yassin et al., 2017)	
	mcr-2-PCR R	GCGGTATCGACATCATAGTCATC TTG				
PCR-2	mcr3-mtpF	ACCAGTAAATCTGGTGGCGT	<i>mcr-3</i>	296	(Lescat et al., 2018)	
	mcr3-mtpR	AGGACAACCTCGTCATAGCA				
	mcr4-mtpF	TTGCAGACGCCCATGGAATA	<i>mcr-4</i>	207	(Lescat et al., 2018)	
	mcr4-mtpR	GCCGCATGAGCTAGTATCGT				
PCR-3	MCR5_fw	ATGCGGTTGTCTGCATTTATC	<i>mcr-5</i>	995	(Borowiak et al., 2017)	
	MCR5_rev	TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG				
	MCR9-F	CTTCCATAACAGCGAGACAC	<i>mcr-9</i>	573	(Yuan et al., 2019)	
	MCR9-R	TATCCTTCCTGCCATCCTC				

4.3.2.5 Electroforesis.

Los productos obtenidos de las PCR dúplex, se analizaron a través de una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % a 110 V durante 45 minutos en un mini-sistema de electroforesis horizontal (Bio-rad). El gel se tiñó con bromuro de etidio (10 mg/mL) y se visualizó en un transiluminador DyNA Light (LabNet).

4.3.3 Evaluación de la resistencia a la colistina a través de ensayos fenotípicos de microdilución en caldo.

Los ensayos fenotípicos de sensibilidad a los antimicrobianos fueron realizados a través del método de microdilución en caldo para conocer la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la colistina frente a los aislados de *S. enterica*. Este método se

realizó de acuerdo con los parámetros y recomendaciones de la Guía CLSI M-100, que indica las normas de rendimiento para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos, y cuyos puntos de corte para colistina frente a miembros de la familia *Enterobacteriaceae* se dividen en Intermedio $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ y Resistente $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ (CLSI, 2023).

4.3.3.1 Preparación del inóculo.

Se estandarizó la preparación del inóculo de *S. enterica*, con el fin de obtener una concentración de 0.5 McFarland, que equivaldría a 1.5×10^8 UFC/mL. Para obtener esta concentración se inocularon 3 mL de caldo ST con 1-3 colonias previamente sembradas en agar ST. Se colocaron 200 μL del inóculo por duplicado en un pocillo de la microplaca de ELISA, que fueron leídos a 625 nm en un espectrofotómetro para microplacas Multiskan™ GO (Thermo Scientific), de acuerdo con la absorbancia registrada, se realizó un periodo de incubación entre 20 - 45 min hasta registrar absorbancias entre 0.1 – 0.08, equivalentes a 0.5 McFarland.

4.3.3.2 Preparación de la solución de colistina.

De acuerdo con las recomendaciones del CLSI M-100, se preparó una solución stock de concentración 40 veces de mayor concentración del punto de corte sugerido. En el caso de la colistina frente a miembros de la familia *Enterobacteriaceae* es de $2 \mu\text{g/mL}$, por lo que se realizarán los cálculos para buscar una concentración de $80 \mu\text{g/mL}$ de acuerdo con la formula recomendada.

$$\frac{1000}{P} \times V \times C = W$$

Donde P es la potencia dada por el proveedor en ($\mu\text{g/mg}$), V el volumen requerido y C la concentración final de la solución y W el peso del antibiótico en mg a disolver en el volumen V (mL). Las recomendaciones de solvente y diluyente en el caso de la colistina son con agua estéril. La solución se mantuvo a temperatura de 2 - 8 °C protegiendo de la humedad y la luz una vez preparada.

4.4 Manejo de Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos.

Con base a la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002; los residuos se deberán separar y envasar, de acuerdo con sus características físicas (líquido o sólido) y biológicas infecciosas. Los cultivos y cepas de agentes biológico-infecciosos a ser desechados, incluidos los utensilios desechables usados para contener, transferir, inocular y mezclar cultivos de agentes biológico-infecciosos, serán envasados en bolsas de polietileno de color rojo resistente al rompimiento y pérdida de contenido al caerse, de material traslúcido de calibre mínimo 200, impermeables y con un contenido de metales pesados de no más de una parte por millón y libres de cloro, además deberán estar marcadas con el símbolo universal de riesgo biológico y la leyenda Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos. Llenadas al 80% de su capacidad, cerrándose antes de ser transportadas al sitio de almacenamiento temporal y no podrán ser abiertas o vaciadas para evitar que se mezclen con la basura común en contenedores metálicos o de plástico con tapa.

Estos residuos fueron tratados por métodos físicos o químicos que garantizaran la eliminación de microorganismos patógenos y deben hacerse irreconocibles para su disposición final. En la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro la empresa encargada de este proceso fue PIREBSA (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales).

4.5 Resultados y discusión.

4.5.1 Análisis de los diferentes alelos del gen *mcr* y selección de iniciadores de PCR para su efectiva detección.

El propósito de este apartado fue analizar y comparar las variantes del gen *mcr* presentes en cepas de *Salmonella* que se encontraran reportadas en la literatura científica recabada, contra una base de datos de secuencias genéticas. Para ello se recopilaron las secuencias de plásmidos de *S. enterica* (n = 1573) depositadas en la base de datos GenBank del NCBI. Posteriormente, se llevó a cabo la anotación de los genes de resistencia presentes en estas secuencias, mediante la búsqueda de homologías con el gen *mcr-1.1* utilizando el programa Resistance Gene Identifier de la base de datos CARD (Alcock et al., 2020).

Para considerar una secuencia como homóloga, se establecieron criterios de identidad de secuencia del 32 - 100% y cobertura del 70 - 100%, esto debido a que es el porcentaje mínimo de identidad entre secuencias de MCR a nivel aminoácido (Partridge et al., 2018). Los resultados obtenidos revelaron la presencia de diversas variantes y subvariantes del gen *mcr*. De las 1,573 secuencias de plásmidos de *Salmonella* analizadas, se encontró homología con el gen *mcr-1* en el 8.26 % (126/1,573) de ellas. Las variantes identificadas se ordenaron de mayor a menor porcentaje de anotación, lo cual se refiere a la presencia de secuencias de ADN en los plásmidos que comparten similitud con las variantes del gen *mcr*, siendo *mcr-9* (67.4%) (85/126), *mcr-1* (16.6%) (21/126), *mcr-3* (8.7%) (11/126), *mcr-4* (3.9%) (5/126), *mcr-5* (2.3%) (3/126) y *mcr-2* (0.7%) (1/126) en orden de frecuencia como se observa en la Figura 5. Estos hallazgos confirman la existencia de las variantes

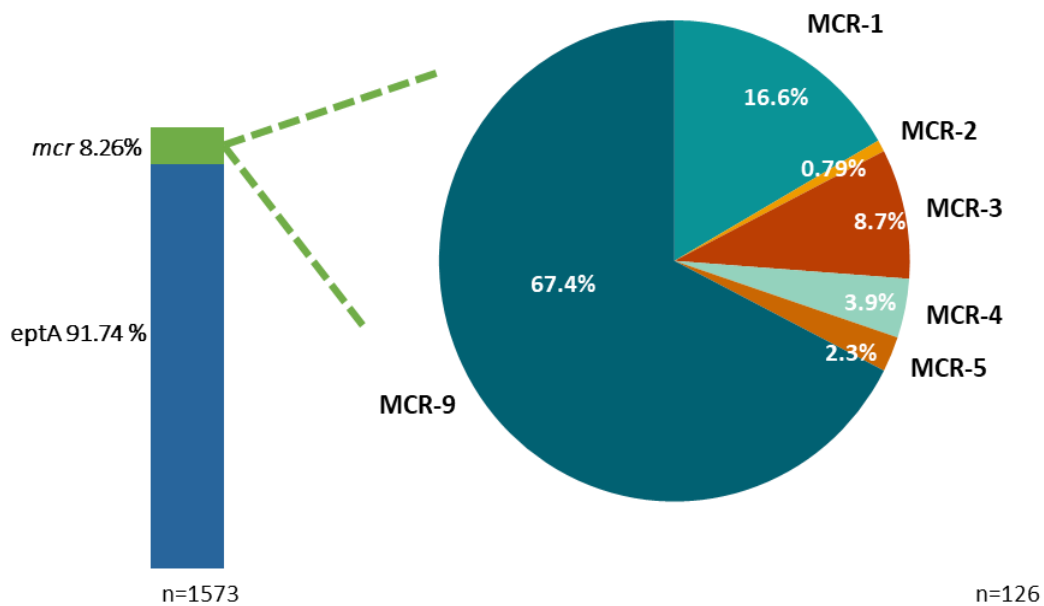


Figura 5. Anotación de genes de resistencia de secuencias homólogas a *mcr-1.1* en n=1573 secuencias de plásmidos de *Salmonella* mediante CARD.

descritas previamente en la literatura científica, permitiéndonos tomar estas como las variantes del gen *mcr* a analizar en nuestras cepas de *S. enterica*.

Si bien, estas variantes del gen *mcr* son las mismas reportadas hasta el momento en la literatura, los porcentajes de presencia de las variantes pueden diferir entre estudios. En la revisión sistemática realizada por Portes y colaboradores en el año 2022, a partir de 48 estudios de prevalencia del gen *mcr* en *S. enterica*, *mcr-1* fue la variante más frecuente, representando más del 80% de los genes *mcr* totales detectados, a comparación de nuestro análisis bioinformático donde *mcr-9* fue el más prevalente con 68.46% (Portes et al., 2022). De igual manera, la región o tipo de aislamiento (muestras humanas, animales o de alimentos) podría jugar un papel importante en el tipo de variante detectada (Anyanwu et al., 2021). En Tailandia, la variante de *mcr* más prevalente en aislamientos clínicos de *Salmonella* es *mcr-3* (91.6%) (Luk-in et al., 2021), y en aislamientos provenientes de origen animal las variantes más detectadas correspondían con *mcr-1* y *mcr-3* (Pungpian et al., 2021), mientras que en regiones como Italia, el gen más detectado en *Salmonella* ha sido

mcr-2 (43.75%), seguido de *mcr-4* (25%), y *mcr-1* y *mcr-8* (12.5%) cada uno; sólo (6.25%) para *mcr-6*, de un total de 16 cepas positivas para *mcr* de muestras ambientales y de origen animal (Bertelloni et al., 2022). A pesar de la variación en los porcentajes de prevalencia, las variantes reportadas se mantienen en *Salmonella* (Lima et al., 2019), pero es de destacar que las muestras humanas presentan una menor tasa de prevalencia de *mcr* en *Salmonella* que en aquellas cepas provenientes de origen animal, pero que las mismas variantes se presentan dentro de la misma región (Li et al., 2022).

4.5.2 Diseño y validación de un ensayo de PCR multiplex capaz de caracterizar la diversidad del gen *mcr* en *S. enterica*.

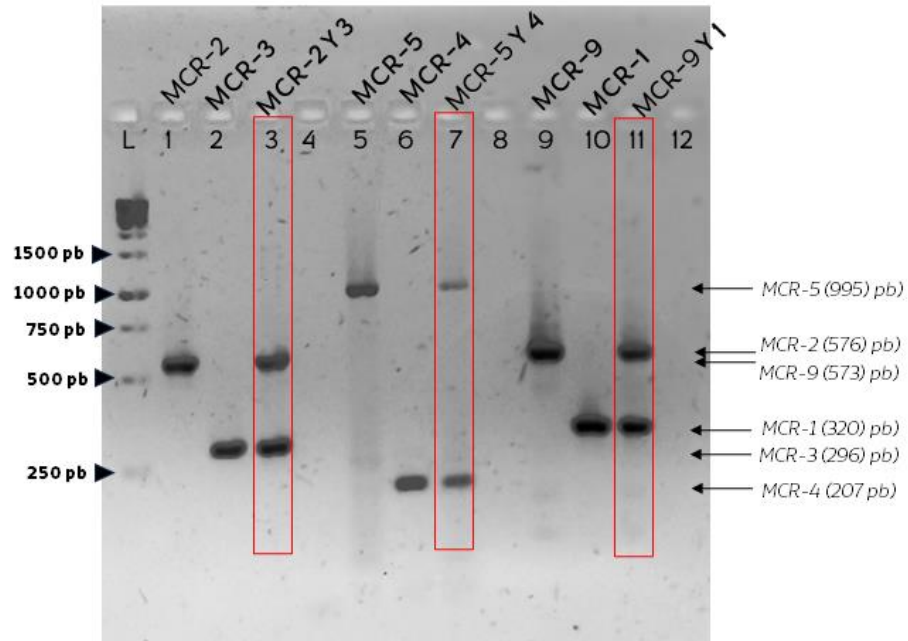


Figura 5. Visualización de las bandas en gel de agarosa (1,5%) para las tres PCR dúplex. La amplificación se realizó utilizando como control positivo las secuencias de control 1 y 2. Como marcador de tamaño molecular se utilizó GeneRuler 1 KB bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Las características de nuestros iniciadores y controles positivos permitieron el diseño de tres PCR dúplex. La primera capaz de lograr amplificación de *mcr-3* y

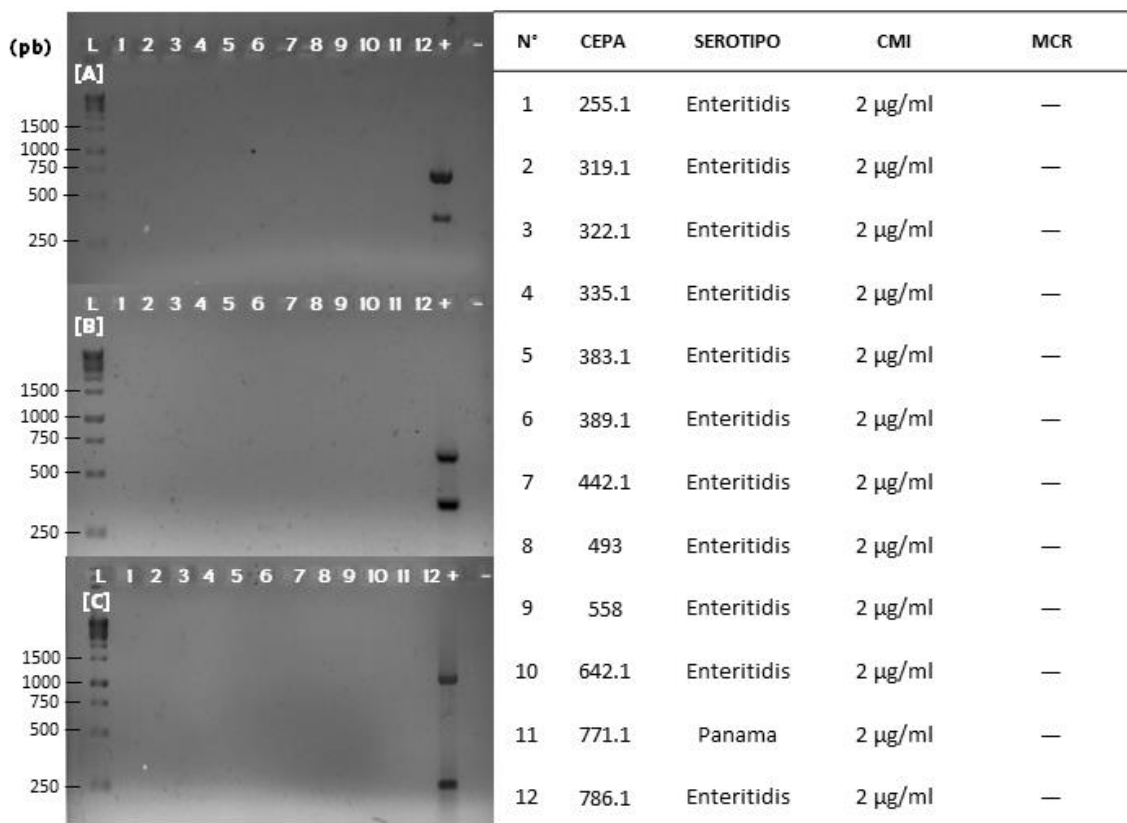


Figura 6. PCR multiplex a muestras de *S. enterica* con CMI 2 µg/mL. Visualización de las bandas en gel de agarosa (1,5%) para los tres protocolos de PCR dúplex [A] *mcr-2* (576pb) y *mcr-3* (296pb); [B] *mcr-1* (320pb) y *mcr-9* (573pb) y [C] *mcr-5* (995pb) y *mcr-4* (207pb). No se observa amplificación en los carriles 1-12 correspondientes a las cepas muestra de *S. enterica*. CTRLMCR-1 y CTRLMCR-2 usados como templado para amplificación de control positivo en carril 13 (+)

mcr-2, la segunda para la amplificación de *mcr-5* y *mcr-4*; y la tercera *mcr-1* y *mcr-9*, como se observa en la Figura 5.

Las 12 cepas de *S. enterica* que mostraron una CMI 2 µg/mL (Tabla 6) fueron sometidas a nuestro protocolo de PCR dúplex en búsqueda de las variantes del gen *mcr* que fueran las responsables de esta CMI. Ninguna de las 12 cepas de *S. enterica* analizadas a través de este protocolo mostró amplificación de alguna de las variantes del gen *mcr* como se observa en la Figura 6. Este proceso fue validado

a través de la amplificación individual de los genes para corroborar los resultados de las PCR dúplex.

El monitoreo del gen *mcr* en patógenos de importancia epidemiológica como *S. enterica* ha sido un reto, debido a la diversidad de variantes que existe de este gen (Martiny et al., 2022; Zhang et al., 2022). El apoyo en cadenas de oligonucleótidos sintéticos para la estandarización de protocolos de amplificación por PCR es una herramienta cada vez más empleada (Bidla et al., 2021; Conte et al., 2018; Straeten et al., 2021). La adquisición de controles positivos como cepas que contengan las diferentes variantes del gen *mcr* puede complicar la estandarización de estas metodologías o la detección de sólo aquellas variantes a las que se pudiera llegar a tener acceso. En México, únicamente se ha reportado la presencia del gen *mcr-1* en cepas de *E. coli* tanto ambientales, como de origen animal y clínicos (Galindo-Méndez et al., 2023; Garza-Ramos et al., 2018; Merida-Vieyra et al., 2019; Rodríguez-Santiago et al., 2022). Mientras que no se han reportado hasta este momento la presencia del gen *mcr* en *Salmonella*.

El uso de colistina en nuestro país no se reporta correctamente. Entre la poca información que existe de este antibiótico está su ausencia en el mercado mexicano por aproximadamente 40 años, hasta su reintroducción a la práctica clínica en 2011, aunque solía comercializarse a través del mercado negro fuera de los grandes hospitales públicos para el tratamiento de bacterias multirresistentes aunque su comercio fuera ilegal (Amabile-Cuevas, 2021; Rodríguez-Santiago et al., 2021). La regulación del uso de colistina en su reintroducción al país, es dada por la normativa mexicana prohíbe el uso de la colistina en la práctica veterinaria desde principios de los años 2000 en la NOM-064-ZOO-2000: Lineamientos para la clasificación y prescripción de productos farmacéuticos veterinarios por el nivel de riesgo de sus ingredientes activos. La prohibición de este medicamento podría ser la responsable de la baja prevalencia del gen *mcr* a diferencia de otros países donde esta fue empleada hasta hace poco de manera descontrolada en la práctica veterinaria.

4.5.3 Evaluación de la resistencia a la colistina a través de ensayos fenotípicos de microdilución en caldo.

Con el propósito de determinar la sensibilidad de las 88 cepas de *S. enterica* frente a la colistina, se realizó la técnica de microdilución en caldo para conocer la CMI siguiendo los parámetros establecidos por el (CLSI-M100). Para cada cepa, se realizaron pruebas duplicadas utilizando 10 concentraciones diferentes de colistina: 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156 y 0.078 $\mu\text{g/mL}$.

La CMI de colistina fue calculada a partir de los resultados obtenidos en las pruebas de microdilución. La Figura 9 muestra los resultados de los cálculos de la CMI para cada una de las concentraciones evaluadas. De los 88 aislamientos de *S. enterica* evaluados, se encontró que la CMI más alta registrada frente a la colistina fue de 1.25 $\mu\text{g/mL}$ en 25 cepas (28.4% del total). El análisis de las CMI reveló que la mayoría de los aislamientos, 35/88 (39.7%), presentaron una CMI igual a 0.625 $\mu\text{g/mL}$. Asimismo, 23 aislamientos (26.13%) mostraron una CMI de 0.312 $\mu\text{g/mL}$ mientras que sólo 6 aislamientos (6.81%) presentaron crecimiento hasta una concentración de 0,312 $\mu\text{g/mL}$.

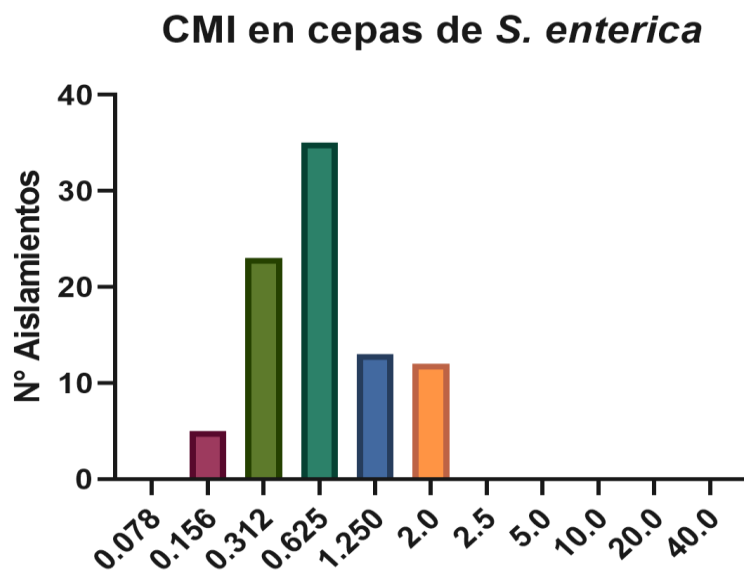


Figura 7. Número de cepas de *S. enterica* y su concentración mínima inhibitoria ante la colistina por el método de microdilución en caldo.

Es importante destacar que todas las cepas evaluadas mostraron una CMI por debajo del punto de corte de resistencia establecido (CLSI), que es de 4 µg/mL. Las 25 cepas que mostraron CMI en 1.25 µg/mL fueron reevaluadas con el fin encontrar si estas mostraban una CMI ≥ 2 µg/mL, que pudieran clasificarlas como resistencia intermedia a la colistina, ya que se ha demostrado que la CMI de colistina en cepas que contienen *mcr* suelen ser de 2-16 µg/mL (Ricci et al., 2020). De estas 25 cepas, 12 de ellas mostraron una CMI de 2 µg/mL, a las cuales pudimos aplicar nuestro ensayo de PCR múltiple. Si bien, se podría discutir que la colistina no es una terapia estándar para las infecciones por *Salmonella* en humanos; sin embargo, la identificación efectiva del punto de corte de resistencia, podría ayudar a identificar tendencias en la resistencia y ser un indicativo por la presencia del gen *mcr* (Tyson et al., 2018).

Ninguna de las 12 cepas elegidas por su valor de CMI (tabla 6), mostró amplificación de alguna variante del gen *mcr* por el método de PCR multiplex. La mayoría de estos aislamientos (11/12) pertenecen al serotipo Enteritidis. Lo que podría explicarse basado en diversos estudios que muestran que la CMI de 2 µg/mL podría estar asociada al serotipo en ausencia del gen *mcr* (Agersø et al., 2012; Alvarez et al., 2020; Luo et al., 2020; Tyson et al., 2018). La CMI para la colistina a nivel de serotipo entre los dos más prevalentes en muestras de origen humano en China, *Salmonella* Enteritidis era significativamente menos susceptible que *Salmonella* Typhimurium, lo que coincide, con nuestros resultados donde el serotipo Typhimurium mostró una CMI de 1.25 µg/mL, por debajo de S. Enteritidis (Luo et al., 2020). En China, el serotipo Enteritidis ha mostrado mayores tasas de resistencia a colistina (64,3%), meropenem (35,7%) y ciprofloxacino (28,6%), lo que es preocupante por la capacidad de este serotipo para infectar a humanos (Wang et al., 2020). El grado de CMI que muestra Enteritidis por arriba de otros serotipos, se ha explicado a través del epítipo del antígeno O, que puede regular su nivel de susceptibilidad a la colistina (Ricci et al., 2020).

Los azúcares inmunodominantes en los antígenos O de las cepas de *S. Enteritidis* están conformados por tyvelosa, que, aunque es muy similar en estructura y sólo difiere en la posición de un grupo hidroxilo de la abequosa (azúcar) presente en Typhimurium), afecta significativamente a la química del antígeno O, impidiendo que la molécula de colistina alcance su objetivo, ya que el componente LPS de la membrana externa bacteriana es el objetivo celular inicial de las polimixinas (Ricci et al., 2020).

Los resultados totales de las CMI de las cepas de *S. enterica* por serotipo puede observarse en la Tabla 6, donde la mayoría del cepario analizado pertenecía al serotipo Enteritidis., por lo que es importante recalcar la baja cantidad de ciertos serotipos. Sin embargo, esta limitación podría superarse mediante la ampliación del número de aislamientos en años posteriores, con el fin de obtener datos concluyentes.

Tabla 6: CMI de *S. enterica* por serotipo. Del total de cepas analizadas (n=88) por el método de microdilución en caldo, se pudo identificar a que serotipo pertenecía. N/A hace referencia a aquellas cepas a las que no se pudo asignar un serotipo.

SEROTIPO \ CMI ug/ml	40	20	10	5	2.5	2	1.25	0.625	0.312	0.156	0.0780
Typhimurium	—	—	—	—	—	—	—	2	3	1	—
Agona	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—
Bareilly	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—
Mbandaka	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—
Enteritidis	—	—	—	—	—	11	10	22	6	1	—
Newport	—	—	—	—	—	—	—	2	—	1	—
Ouakam	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—
Anatum	—	—	—	—	—	—	—	2	2	1	—
Kentucky	—	—	—	—	—	—	—	—	3	—	—
Panama	—	—	—	—	—	—	1	1	—	—	—
Senftenberg	—	—	—	—	—	—	1	—	2	—	—
Bredeney	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—
Oranienburg	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—
Heidelberg	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—
Infantis	—	—	—	—	—	—	1	2	2	—	—
Choleraesuis	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—
N/A	—	—	—	—	—	—	—	1	2	—	—

5 Conclusiones.

En el presente estudio se desarrolló un protocolo molecular para la detección de seis variantes del gen *mcr* que se han reportado hasta el momento en *S. enterica*, a través del uso de un control positivo sintético que permitiera la amplificación por el método de PCR dúplex. La baja prevalencia y gran variabilidad de este gen aumenta la dificultad para el acceso a cepas que contengan estos diferentes genes, por lo que la estandarización con controles positivos de este tipo facilita el acceso y vigilancia epidemiológica de este gen.

Ninguna de las cepas de *S. enterica* analizadas por el método de microdilución mostró alguna cepa con una CMI por arriba del punto de corte de resistencia (4 µg/mL) establecido por el CLSI. A pesar de esto, la CMI más alta fue de 2µg/mL en cepas con serotipo Enteritidis, lo que podría asociar a este serotipo con una menor sensibilidad a la colistina aun en ausencia del gen *mcr*.

La ausencia del gen *mcr* en nuestras cepas zoonóticas nos muestra un panorama positivo donde la colistina todavía puede ser un recurso viable para combatir a bacterias multirresistentes a los antibióticos como última línea de defensa. El control actual del uso racional de la colistina y el monitoreo epidemiológico de las variantes del gen *mcr* presentes en una bacteria de gran importancia como *S. enterica* puede ayudarnos a seguir cuidando la efectividad de este antibiótico.

6 Referencias

- Abdullah, K., Iwen, P. C., & Abdalhamid, B. (2021). Identification of an mcr-9-Carrying *Salmonella enterica* Serotype Heidelberg Strain Isolated from Blood. *Microbiology Resource Announcements*, *10*(34), e00676-21. <https://doi.org/10.1128/MRA.00676-21>
- Agersø, Y., Torpdahl, M., Zachariassen, C., Seyfarth, A., Hammerum, A. M., & Nielsen, E. M. (2012). Tentative Colistin Epidemiological Cut-Off Value for *Salmonella* spp. *Foodborne Pathogens and Disease*, *9*(4), 367-369. <https://doi.org/10.1089/fpd.2011.1015>
- Aghapour, Z., Gholizadeh, P., Ganbarov, K., Bialvaei, A. Z., Mahmood, S. S., Tanomand, A., Yousefi, M., Asgharzadeh, M., Yousefi, B., & Kafil, H. S. (2019). Molecular mechanisms related to colistin resistance in Enterobacteriaceae. *Infection and Drug Resistance*, *12*, 965-975. <https://doi.org/10.2147/IDR.S199844>
- Aguirre, A. A., Longcore, T., Barbieri, M., Dabritz, H., Hill, D., Klein, P. N., Lepczyk, C., Lilly, E. L., McLeod, R., Milcarsky, J., Murphy, C. E., Su, C., VanWormer, E., Yolken, R., & Sizemore, G. C. (2019). The One Health Approach to Toxoplasmosis: Epidemiology, Control, and Prevention Strategies. *EcoHealth*, *16*(2), 378-390. <https://doi.org/10.1007/s10393-019-01405-7>
- Alcock, B. P., Raphenya, A. R., Lau, T. T. Y., Tsang, K. K., Bouchard, M., Edalatmand, A., Huynh, W., Nguyen, A.-L. V., Cheng, A. A., Liu, S., Min, S. Y., Miroshnichenko, A., Tran, H.-K., Werfalli, R. E., Nasir, J. A., Oloni, M., Speicher, D. J., Florescu, A., Singh, B., ... McArthur, A. G. (2020). CARD 2020: Antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*, *48*(D1), D517-D525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz935>
- Alós, J.-I. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: Una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *33*(10), 692-699. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>
- Alvarez, J., Lopez, G., Muellner, P., de Frutos, C., Ahlstrom, C., Serrano, T., Moreno, M. A., Duran, M., Saez, J. L., Dominguez, L., & Ugarte-Ruiz, M. (2020). Identifying emerging trends in antimicrobial resistance using *Salmonella* surveillance data in poultry in Spain. *Transboundary and Emerging Diseases*, *67*(1), 250-262. <https://doi.org/10.1111/tbed.13346>
- Amabile-Cuevas, C. F. (2021). Antibiotic usage and resistance in Mexico: An update after a decade of change. *The Journal of Infection in Developing Countries*, *15*(04), 442-449. <https://doi.org/10.3855/jidc.13467>

- Andino, A., & Hanning, I. (2015). Salmonella enterica: Survival, Colonization, and Virulence Differences among Serovars. *The Scientific World Journal*, 2015, e520179. <https://doi.org/10.1155/2015/520179>
- Anyanwu, M. U., Jaja, I. F., Okpala, C. O. R., Jaja, C.-J. I., Oguttu, J. W., Chah, K. F., & Shoyinka, V. S. (2021). Potential sources and characteristic occurrence of mobile colistin resistance (mcr) gene-harboring bacteria recovered from the poultry sector: A literature synthesis specific to high-income countries. *PeerJ*, 9, e11606. <https://doi.org/10.7717/peerj.11606>
- Bearson, S. M. D. (2022). Salmonella in Swine: Prevalence, Multidrug Resistance, and Vaccination Strategies. *Annual Review of Animal Biosciences*, 10(1), 373-393. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-013120-043304>
- Bertani, B., & Ruiz, N. (2018). Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. *EcoSal Plus*, 8(1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018>
- Bertelloni, F., Cagnoli, G., Turchi, B., & Ebani, V. V. (2022). Low Level of Colistin Resistance and mcr Genes Presence in Salmonella spp.: Evaluation of Isolates Collected between 2000 and 2020 from Animals and Environment. *Antibiotics*, 11(2), 272. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020272>
- Bialvaei, A. Z., & Samadi-Kafil, H. (2015). Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Current Medical Research and Opinion*, 31(4), 707-721. <https://doi.org/10.1185/03007995.2015.1018989>
- Bidla, G., Rosenblatt, D. S., & Gilfix, B. M. (2021). Identification of Variants in Alpha-1-Antitrypsin by High Resolution Melting. *The Journal of Applied Laboratory Medicine*, 6(3), 715-728. <https://doi.org/10.1093/jalm/jfaa191>
- Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderon, J. A., Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, M., Bernardini, A., Sanchez, M. B., & Martinez, J. L. (2016). Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. *Microorganisms*, 4(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4010014>
- Borowiak, M., Baumann, B., Fischer, J., Thomas, K., Deneke, C., Hammerl, J. A., Szabo, I., & Malorny, B. (2020). Development of a Novel mcr-6 to mcr-9 Multiplex PCR and Assessment of mcr-1 to mcr-9 Occurrence in Colistin-Resistant Salmonella enterica Isolates From Environment, Feed, Animals and Food (2011–2018) in Germany. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.00080>

- Borowiak, M., Fischer, J., Hammerl, J. A., Hendriksen, R. S., Szabo, I., & Malorny, B. (2017). Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Paratyphi B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *72*(12), 3317-3324. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx327>
- Campos, J., Cristino, L., Peixe, L., & Antunes, P. (2016). MCR-1 in multidrug-resistant and copper-tolerant clinically relevant *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- and S. Rissen clones in Portugal, 2011 to 2015. *Eurosurveillance*, *21*(26), 30270. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.26.30270>
- Canene-Adams, K. (2013). Chapter Twenty Four—General PCR. En J. Lorsch (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 529, pp. 291-298). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00024-0>
- Carattoli, A., Villa, L., Feudi, C., Curcio, L., Orsini, S., Luppi, A., Pezzotti, G., & Magistrali, C. F. (2017). Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Eurosurveillance*, *22*(31), 30589. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30589>
- Carnevali, C., Morganti, M., Scaltriti, E., Bolzoni, L., Pongolini, S., & Casadei, G. (2016). Occurrence of *mcr-1* in Colistin-Resistant *Salmonella enterica* Isolates Recovered from Humans and Animals in Italy, 2012 to 2015. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *60*(12), 7532-7534. <https://doi.org/10.1128/AAC.01803-16>
- Carretto, E., Brovarone, F., Nardini, P., Russello, G., Barbarini, D., Pongolini, S., Gagliotti, C., Carattoli, A., & Sarti, M. (2018). Detection of *mcr-4* positive *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in clinical isolates of human origin, Italy, October to November 2016. *Eurosurveillance*, *23*(2), 17. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.2.17-00821>
- Carroll, L. M., Gaballa, A., Guldemann, C., Sullivan, G., Henderson, L. O., & Wiedmann, M. (2019). Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene *mcr-9* in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolate. *mBio*, *10*(3), e00853-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.00853-19>
- Carroll, L. M., Zurfluh, K., Jang, H., Gopinath, G., Nüesch-Inderbinen, M., Poirel, L., Nordmann, P., Stephan, R., & Guldemann, C. (2018). First report of an *mcr-1*-harboring *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serotype 4,5,12:i:- strain isolated from blood of a patient in Switzerland.

- International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(5), 740-741.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.08.003>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2022, noviembre 8). *One Health Basics | One Health | CDC*.
<https://www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2023). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI M100* (33rd ed). https://clsi.org/media/tc4b1paf/m10033_samplepages-1.pdf
- Conte, J., Potoczniak, M. J., & Tobe, S. S. (2018). Using synthetic oligonucleotides as standards in probe-based qPCR. *BioTechniques*, 64(4), 177-179. <https://doi.org/10.2144/btn-2018-2000>
- Doumith, M., Godbole, G., Ashton, P., Larkin, L., Dallman, T., Day, M., Day, M., Muller-Pebody, B., Ellington, M. J., de Pinna, E., Johnson, A. P., Hopkins, K. L., & Woodford, N. (2016). Detection of the plasmid-mediated mcr-1 gene conferring colistin resistance in human and food isolates of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in England and Wales. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(8), 2300-2305. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw093>
- El-Sayed, M. A. E.-G. A., Zhong, L.-L., Shen, C., Yang, Y., Doi, Y., & Tian, G.-B. (2020). Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: An extended review (2000–2019). *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 868-885. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1754133>
- Galindo-Méndez, M., Navarrete-Salazar, H., Pacheco-Vásquez, R., Quintas-de la Paz, D., Baltazar-Jiménez, I., Santiago-Luna, J. D., & Guadarrama-Monroy, L. (2023). Detection of Plasmid-Mediated Resistance against Colistin in Multi-Drug-Resistant Gram-Negative Bacilli Isolated from a Tertiary Hospital. *Microorganisms*, 11(8), 1996. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11081996>
- Gal-Mor, O. (2019). Persistent Infection and Long-Term Carriage of Typhoidal and Nontyphoidal Salmonellae. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(1), e00088-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-18>
- Garcia-Graells, C., De Keersmaecker, S. C. J., Vanneste, K., Pochet, B., Vermeersch, K., Roosens, N., Dierick, K., & Botteldoorn, N. (2018). Detection of Plasmid-Mediated Colistin Resistance, mcr-1 and mcr-2 Genes, in *Salmonella* spp. Isolated from Food at Retail in Belgium from 2012 to 2015. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15(2), 114-117. <https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2329>
- Gargano, V., Gambino, D., Migliore, S., Vitale, M., Sciortino, S., Costa, A., & Vicari, D. (2021). Can Human Handling Increase the Presence of

- Multidrug Resistance (MDR) in Salmonella spp. Isolated from Food Sources? *Microorganisms*, 9(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102018>
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1-4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- Garza-Ramos, U., Tamayo-Legorreta, E., Arellano-Quintanilla, D. M., Rodriguez-Medina, N., Silva-Sanchez, J., Catalan-Najera, J., Rocha-Martínez, M. K., Bravo-Díaz, M. A., & Alpuche-Aranda, C. (2018). Draft Genome Sequence of a Multidrug- and Colistin-Resistant mcr-1-Producing Escherichia coli Isolate from a Swine Farm in Mexico. *Genome Announcements*, 6(10), e00102-18. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00102-18>
- Gonzalez-Avila, L. U., Loyola-Cruz, M. A., Hernández-Cortez, C., Bello-López, J. M., & Castro-Escarpulli, G. (2021). Colistin Resistance in Aeromonas spp. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/ijms22115974>
- Gordillo-Altamirano, F. L., & Barr, J. J. (2019). Phage Therapy in the Postantibiotic Era. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(2), e00066-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-18>
- Idelevich, E. A., & Becker, K. (2019). How to accelerate antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(11), 1347-1355. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.04.025>
- Jajere, S. M. (2019). A review of Salmonella enterica with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Veterinary World*, 12(4), 504-521. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.504-521>
- Jiménez Pearson, M. A., Galas, M., Corso, A., Hormazábal, J. C., Duarte Valderrama, C., Salgado Marcano, N., Ramón-Pardo, P., & Melano, R. G. (2019). Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 43, e65. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2019.65>
- Jribi, H., Sellami, H., Amor, S. B., Ducournau, A., Sifré, E., Benejat, L., Mégraud, F., & Gdoura, R. (2020). Occurrence and Antibiotic Resistance of Arcobacter Species Isolates from Poultry in Tunisia. *Journal of Food Protection*, 83(12), 2080-2086. <https://doi.org/10.4315/JFP-20-056>

- Kalendar, R. (2022). A Guide to Using FASTPCR Software for PCR, In Silico PCR, and Oligonucleotide Analysis. En C. Basu (Ed.), *PCR Primer Design* (pp. 223-243). SpringerUS. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1799-1_16
- Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 33(3), 300. https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15
- Knodler, L. A., & Effenbein, J. R. (2019). Salmonella enterica. *Trends in Microbiology*, 27(11), 964-965. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.05.002>
- Kowalska-Krochmal, B., & Dudek-Wicher, R. (2021). The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(2), 165. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020165>
- Lerminiaux, N. A., & Cameron, A. D. S. (2019). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology*, 65(1), 34-44. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0275>
- Li, J., Beuerman, R., & Verma, C. S. (2020). Mechanism of polyamine induced colistin resistance through electrostatic networks on bacterial outer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1862(9), 183297. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183297>
- Li, P., Zhan, L. I., Wang, H., Gao, W., Gao, L., Lv, S., Zhang, X., Zhu, G., & Yan, Y. (2022). First Identification and Limited Dissemination of mcr-1 Colistin Resistance in Salmonella Isolates from Jiaying. *Journal of Food Protection*, 85(2), 213-219. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-069>
- Li, X.-P., Fang, L.-X., Song, J.-Q., Xia, J., Huo, W., Fang, J.-T., Liao, X.-P., Liu, Y.-H., Feng, Y., & Sun, J. (2016). Clonal spread of mcr-1 in PMQR-carrying ST34 Salmonella isolates from animals in China. *Scientific Reports*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep38511>
- Lima, T., Domingues, S., & Da Silva, G. J. (2019). Plasmid-Mediated Colistin Resistance in Salmonella enterica: A Review. *Microorganisms*, 7(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7020055>
- Ling, Z., Yin, W., Shen, Z., Wang, Y., Shen, J., & Walsh, T. R. (2020). Epidemiology of mobile colistin resistance genes mcr-1 to mcr-9. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(11), 3087-3095. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa205>
- Littrup, E., Kiil, K., Hammerum, A. M., Roer, L., Nielsen, E. M., & Torpdahl, M. (2017). Plasmid-borne colistin resistance gene mcr-3 in Salmonella

- isolates from human infections, Denmark, 2009–17. *Eurosurveillance*, 22(31), 30587. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30587>
- Liu, G., Qian, H., Lv, J., Tian, B., Bao, C., Yan, H., & Gu, B. (2021). Emergence of mcr-1-Harboring *Salmonella enterica* Serovar Sinstorf Type ST155 Isolated From Patients With Diarrhea in Jiangsu, China. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.723697>
- Liu, Y.-Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L.-X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.-F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J.-H., & Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2), 161-168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
- Lowman, W. (2018). Minimum inhibitory concentration-guided antimicrobial therapy—The Achilles heel in the antimicrobial stewardship agenda. *South African Medical Journal = Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Geneeskunde*, 108(9), 710-712. <https://doi.org/10.7196/SAMJ.2018.v108i9.13285>
- Luk-in, S., Chatsuwana, T., Kueakulpattana, N., Rirerm, U., Wannigama, D. L., Plongla, R., Lawung, R., Pulsrikarn, C., Chantaroj, S., Chaichana, P., Saksasengsopa, N., Shanthachol, T., Techapornroong, M., Chayangsu, S., & Kulwichit, W. (2021). Occurrence of mcr-mediated colistin resistance in *Salmonella* clinical isolates in Thailand. *Scientific Reports*, 11, 14170. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93529-6>
- Luo, Q., Wang, Y., Fu, H., Yu, X., Zheng, B., Chen, Y., Berglund, B., & Xiao, Y. (2020). Serotype Is Associated With High Rate of Colistin Resistance Among Clinical Isolates of *Salmonella*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 592146. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.592146>
- Madeira, F., Park, Y. mi, Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A. R. N., Potter, S. C., Finn, R. D., & Lopez, R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W636-W641. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>
- Martín-Peña, R., Domínguez-Herrera, J., Pachón, J., & McConnell, M. J. (2013). Rapid detection of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* using quantitative real-time PCR. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(7), 1572-1575. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt057>

- Martiny, H.-M., Munk, P., Brinch, C., Szarvas, J., Aarestrup, F. M., & Petersen, T. N. (2022). Global Distribution of *mcr* Gene Variants in 214K Metagenomic Samples. *mSystems*, 7(2), e00105-22. <https://doi.org/10.1128/msystems.00105-22>
- McEwen, S. A., & Collignon, P. J. (2018). Antimicrobial Resistance: A One Health Perspective. *Microbiology Spectrum*, 6(2), 6.2.10. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017>
- McLain, J. E., Cytryn, E., Durso, L. M., & Young, S. (2016). Culture-based Methods for Detection of Antibiotic Resistance in Agroecosystems: Advantages, Challenges, and Gaps in Knowledge. *Journal of Environmental Quality*, 45(2), 432-440. <https://doi.org/10.2134/jeq2015.06.0317>
- Mendes-Oliveira, V. R., Paiva, M. C., & Lima, W. G. (2019). Plasmid-mediated colistin resistance in Latin America and Caribbean: A systematic review. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 31, 101459. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2019.07.015>
- Merida-Vieyra, J., Ranero, A. D. C., Arzate-Barbosa, P., Garza, E. A. la, Méndez-Tenorio, A., Murcia-Garzón, J., & Aquino-Andrade, A. (2019). First clinical isolate of *Escherichia coli* harboring *mcr-1* gene in Mexico. *PLOS ONE*, 14(4), e0214648. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214648>
- Mmatli, M., Mbelle, N. M., & Osei Sekyere, J. (2022). Global epidemiology, genetic environment, risk factors and therapeutic prospects of *mcr* genes: A current and emerging update. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 941358. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.941358>
- Moffatt, J. H., Harper, M., & Boyce, J. D. (2019). Mechanisms of Polymyxin Resistance. En J. Li, R. L. Nation, & K. S. Kaye (Eds.), *Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside* (pp. 55-71). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16373-0_5
- Mohapatra, S. S., Dwibedy, S. K., & Padhy, I. (2021). Polymyxins, the last-resort antibiotics: Mode of action, resistance emergence, and potential solutions. *Journal of Biosciences*, 46(3), 85. <https://doi.org/10.1007/s12038-021-00209-8>
- Mulvey, M. R., Bharat, A., Boyd, D. A., Irwin, R. J., & Wylie, J. (2018). Characterization of a colistin-resistant *Salmonella enterica* 4,[5],12:i:- harbouring *mcr-3.2* on a variant IncHI-2 plasmid identified in Canada. *Journal of Medical Microbiology*, 67(12), 1673-1675. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000854>

- Organización Mundial de la Salud. (2018). *Salmonella (no tifoidea)*. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))
- Park, S.-H., Ryu, S., & Kang, D.-H. (2012). Development of an Improved Selective and Differential Medium for Isolation of *Salmonella* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, *50*(10), 3222-3226. <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-12>
- Parry, C. M., & Threlfall, E. J. (2008). Antimicrobial resistance in typhoidal and nontyphoidal salmonellae. *Current Opinion in Infectious Diseases*, *21*(5), 531. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32830f453a>
- Parte, A. C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J. P., Reimer, L. C., & Göker, M. (2020). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *70*(11), 5607-5612. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004332>
- Partridge, S. R., Di Pilato, V., Doi, Y., Feldgarden, M., Haft, D. H., Klimke, W., Kumar-Singh, S., Liu, J.-H., Malhotra-Kumar, S., Prasad, A., Rossolini, G. M., Schwarz, S., Shen, J., Walsh, T., Wang, Y., & Xavier, B. B. (2018). Proposal for assignment of allele numbers for mobile colistin resistance (mcr) genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *73*(10), 2625-2630. <https://doi.org/10.1093/jac/dky262>
- Pliakos, E. E., Andreatos, N., Shehadeh, F., Ziakas, P. D., & Mylonakis, E. (2018). The Cost-Effectiveness of Rapid Diagnostic Testing for the Diagnosis of Bloodstream Infections with or without Antimicrobial Stewardship. *Clinical Microbiology Reviews*, *31*(3), e00095-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00095-17>
- Pons, M. J., Toro, M. de, Medina, S., Sáenz, Y., & Blázquez, J. R. (2020). Antimicrobianos, resistencia antibacteriana y salud sostenible. *South Sustainability*, *1*(1), Article 1. <https://doi.org/10.21142/SS-0101-2020-001>
- Portes, A. B., Rodrigues, G., Leitão, M. P., Ferrari, R., Conte Junior, C. A., & Panzenhagen, P. (2022). Global distribution of plasmid-mediated colistin resistance mcr gene in *Salmonella*: A systematic review. *Journal of Applied Microbiology*, *132*(2), 872-889. <https://doi.org/10.1111/jam.15282>
- Pungpian, C., Lee, S., Trongjit, S., Sinwat, N., Angkittrakul, S., Prathan, R., Srisanga, S., & Chuanchuen, R. (2021). Colistin resistance and plasmid-mediated mcr genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolated from pigs, pig carcass and pork in Thailand, Lao PDR and Cambodia border

- provinces. *Journal of Veterinary Science*, 22(5), e68. <https://doi.org/10.4142/jvs.2021.22.e68>
- Rahman, M. T., Uddin, M. S., Sultana, R., Moue, A., & Setu, M. (2013). Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal*, 4(1), Article 1. <https://doi.org/10.3329/akmmcj.v4i1.13682>
- Ratto-Tespestini, A. C., Pérez-Chaparro, P. J., Romito, G. A., Figueiredo, L. C., Faveri, M., Carillo, H. P., Larcher, P., & Feres, M. (2016). Comparison of independent and dependent culture methods for the detection of transient bacteremia in diabetic subjects with chronic periodontitis. *Biomédica*, 36(1), Article 1. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i1.2674>
- Rau, R. B., de Lima-Morales, D., Wink, P. L., Ribeiro, A. R., & Barth, A. L. (2020). Salmonella enterica mcr-1 Positive from Food in Brazil: Detection and Characterization. *Foodborne Pathogens and Disease*, 17(3), 202-208. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2700>
- Rebelo, A. R., Bortolaia, V., Kjeldgaard, J. S., Pedersen, S. K., Leekitchaenphon, P., Hansen, I. M., Guerra, B., Malorny, B., Borowiak, M., Hammerl, J. A., Battisti, A., Franco, A., Alba, P., Perrin-Guyomard, A., Granier, S. A., Escobar, C. D. F., Malhotra-Kumar, S., Villa, L., Carattoli, A., & Hendriksen, R. S. (2018). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes. *Eurosurveillance*, 23(6), 17. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672>
- Reller, L. B., Weinstein, M., Jorgensen, J. H., & Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49(11), 1749-1755. <https://doi.org/10.1086/647952>
- Reygaert, W. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482-501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- Ricci, V., Zhang, D., Teale, C., & Piddock, L. J. V. (2020). The O-Antigen Epitope Governs Susceptibility to Colistin in Salmonella enterica. *mBio*, 11(1), e02831-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.02831-19>
- Rodríguez-Santiago, J., Cornejo-Juárez, P., Silva-Sánchez, J., & Garza-Ramos, U. (2021). Polymyxin resistance in Enterobacterales: Overview and epidemiology in the Americas. *International Journal of Antimicrobial*

- Agents*, 58(5), 106426.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106426>
- Rodríguez-Santiago, J., Rodríguez-Medina, N., Tamayo-Legorreta, E. M., Silva-Sánchez, J., Téllez-Sosa, J., Duran-Bedolla, J., Aguilar-Vera, A., Lecona-Valera, A. N., Garza-Ramos, U., & Alpuche-Aranda, C. (2022). Molecular and Genomic Insights of mcr-1-Producing *Escherichia coli* Isolates from Piglets. *Antibiotics*, 11(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020157>
- Saavedra, S. Y., Diaz, L., Wiesner, M., Correa, A., Arévalo, S. A., Reyes, J., Hidalgo, A. M., de la Cadena, E., Perenguez, M., Montaña, L. A., Ardila, J., Ríos, R., Ovalle, M. V., Díaz, P., Porras, P., Villegas, M. V., Arias, C. A., Beltrán, M., & Duarte, C. (2017). Genomic and Molecular Characterization of Clinical Isolates of Enterobacteriaceae Harboring mcr-1 in Colombia, 2002 to 2016. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(12), e00841-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00841-17>
- Sahu, B., Singh, S. D., Behera, B. K., Panda, S. K., Das, A., & Parida, P. K. (2019). Rapid detection of Salmonella contamination in seafoods using multiplex PCR. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50(3), 807-816. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00072-8>
- Sinclair. (2019). *Importance of a One Health approach in advancing global health security and the Sustainable Development Goals*. 38(1), 145. <https://doi.org/10.20506/rst.38.1.2949>
- Straeten, J. V. der, Brouwer, W. D., Kabongo, E., Dresse, M.-F., Fostier, K., Schots, R., Riet, I. V., & Bakkus, M. (2021). Validation of a PCR-Based Next-Generation Sequencing Approach for the Detection and Quantification of Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia and Multiple Myeloma Using gBlocks as Calibrators. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 23(5), 599-611. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2021.01.009>
- Trinh, T. N. D., & Lee, N. Y. (2021). Nucleic acid amplification-based microfluidic approaches for antimicrobial susceptibility testing. *Analyst*, 146(10), 3101-3113. <https://doi.org/10.1039/D1AN00180A>
- Türkel, İ., Yıldırım, T., Yazgan, B., Bilgin, M., & Başbulut, E. (2018). Relationship between antibiotic resistance, efflux pumps, and biofilm formation in extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Chemotherapy*, 30(6-8), 354-363. <https://doi.org/10.1080/1120009X.2018.1521773>

- Tyson, G. H., Bodeis-Jones, S., Caidi, H., Cook, K., Dessai, U., Haro, J., McCullough, A. E., Meng, J., Morales, C. A., Lawrence, J. P., Tillman, G. E., Winslow, A., & Miller, R. A. (2018). Proposed Epidemiological Cutoff Values for Ceftriaxone, Cefepime, and Colistin in Salmonella. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15(11), 701-704. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2490>
- Vandeweyer, D., Milanović, V., Garofalo, C., Osimani, A., Clementi, F., Van Campenhout, L., & Aquilanti, L. (2019). Real-time PCR detection and quantification of selected transferable antibiotic resistance genes in fresh edible insects from Belgium and the Netherlands. *International Journal of Food Microbiology*, 290, 288-295. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.027>
- Wang, C., Feng, Y., Liu, L., Wei, L., Kang, M., & Zong, Z. (2020). Identification of novel mobile colistin resistance gene mcr-10. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 508-516. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1732231>
- Wang, X., Wang, H., Li, T., Liu, F., Cheng, Y., Guo, X., Wen, G., Luo, Q., Shao, H., Pan, Z., & Zhang, T. (2020). Characterization of Salmonella spp. Isolated from chickens in Central China. *BMC Veterinary Research*, 16, 299. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02513-1>
- Wang, Y., Hou, N., Johnston, J., Sarreal, C., Jarosh, J., Hughes, A. C., Gu, Y., & He, X. (2020). Low prevalence of mobile colistin-resistance in U.S. meat, catfish, poultry and genomic characterization of a mcr-1 positive Escherichia coli strain. *Food Control*, 118, 107434. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107434>
- Wang, Y., Zhou, Y., Li, J., Yin, W., Wang, S., Zhang, S., Shen, J., Shen, Z., & Wang, Y. (2018). Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, mcr-8, in NDM-producing Klebsiella pneumoniae. *Emerging Microbes & Infections*, 7(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0124-z>
- Waters, D. L. E., & Shapter, F. M. (2014). The Polymerase Chain Reaction (PCR): General Methods. En R. J. Henry & A. Furtado (Eds.), *Cereal Genomics: Methods and Protocols* (pp. 65-75). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-715-0_7
- Wolff, N., Hendling, M., Schroeder, F., Schönthaler, S., Geiss, A. F., Bedenic, B., & Barišić, I. (2021). Full pathogen characterisation: Species identification including the detection of virulence factors and antibiotic resistance genes via multiplex DNA-assays. *Scientific Reports*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85438-5>

- Wright, G. D. (2010). Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? *BMC Biology*, 8(1), 123. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-123>
- Xavier, B. B., Lammens, C., Ruhai, R., Kumar-Singh, S., Butaye, P., Goossens, H., & Malhotra-Kumar, S. (2016). Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Eurosurveillance*, 21(27), 30280. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.27.30280>
- Yang, Y.-Q., Li, Y.-X., Lei, C.-W., Zhang, A.-Y., & Wang, H.-N. (2018). Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(7), 1791-1795. <https://doi.org/10.1093/jac/dky111>
- Yao, H., & Yiu, S.-M. (2019). Deep analysis and optimization of CARD antibiotic resistance gene discovery models. *BMC Genomics*, 20(10), 914. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6318-5>
- Yin, W., Li, H., Shen, Y., Liu, Z., Wang, S., Shen, Z., Zhang, R., Walsh, T. R., Shen, J., & Wang, Y. (2017). Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *mBio*, 8(3), e00543-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00543-17>
- Yinxia-Li, Zhang, Y., Chen, M., Hu, J., Zhang, H., Xiang, Y., Yang, H., Qiu, S., & Song, H. (2021). Plasmid-borne colistin resistance gene *mcr-1* in a multidrug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolate from an infant with acute diarrhea in China. *International Journal of Infectious Diseases*, 103, 13-18. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.11.150>
- Yu, T., Jiang, G., Gao, R., Chen, G., Ren, Y., Liu, J., van der Mei, H. C., & Busscher, H. J. (2020). Circumventing antimicrobial-resistance and preventing its development in novel, bacterial infection-control strategies. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 17(8), 1151-1164. <https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1779697>
- Zhang, H., Morrison, S., & Tang, Y.-W. (2015). Multiplex Polymerase Chain Reaction Tests for Detection of Pathogens Associated with Gastroenteritis. *Clinics in Laboratory Medicine*, 35(2), 461-486. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.02.006>
- Zhang, H., Yu, F., Lu, X., Li, Y., Peng, D., Wang, Z., & Liu, Y. (2022). Rapid Detection of MCR-Mediated Colistin Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 10(3), e0092022. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00920-22>

