



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

IDENTIFICACIÓN DE GENES PLASMÍDICOS Y CROMOSOMALES
ASOCIADOS A RESISTENCIA A QUINOLONAS EN CEPAS DE
***E. COLI* PATÓGENA AVIAR (APEC)**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
CAROLINA DEL RÍO ÁVILA

TUTOR PRINCIPAL: DR. RIGOBERTO HERNÁNDEZ CASTRO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

COMITÉ TUTOR: DR. FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM
DR. EFRÉN DÍAZ APARICIO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A MADRE ARYA TARA

A LAS TRES JOYAS, BUDHA, EL DHARMA Y LA SANGHA

A DIOS

OM TARE TUTTARE TURE SOHA

DEDICATORIA

Con todo mi agradecimiento a quienes me han dado su amor de la mejor manera que han podido y a quienes voluntaria o involuntariamente dejaron en mi paso ayuda desinteresada, interesada, sincera o forzada, e incluso a aquellos que impusieron obstáculos, y que al final del camino me ayudaron, ya sea para el término de este trabajo o para hacerme más fuerte, sabia o compasiva:

Mis papás Carlos del Río Priego y Ma.de los Angeles Avila Fons, mi hermano Fernando del Río Ávila, mi compañero y equipo de vida H. Salvador Sigüenza Escamilla, mis princesas Cleo, Maya y Molly, mi tutor Rigoberto Hernández Castro, mi comité tutorial Francisco Suárez Güemes y Efrén Díaz Aparicio, mis compañeros de laboratorio, mis amigos Ma. Isabel Balderas Xicohtécatl, Ricardo Núñez Ortega, César A. Rodríguez Balderas y José F. Lazcano Malo, secretaria de asuntos escolares de posgrado Clara Aguillón García e integrantes de la Coordinación de Posgrado de la Facultad.

AGRADECIMIENTOS

- A CONACYT por el otorgamiento de la beca número 211863.
- A los miembros del jurado por su valiosa aportación y por el tiempo dedicado: Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira, Dr. Ángel Hipólito Manjarrez Hernández, Dra. Cecilia Rosario Cortés, Dr. Gary García Espinosa.
- Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Ecología de Agentes Patógenos del Hospital General Dr. Manuel Gea González de la Ciudad de México y en el laboratorio de Diagnóstico Epidemiológico del Instituto Nacional de Salud Pública de Cuernavaca, Morelos.

RESUMEN

DEL RÍO ÁVILA CAROLINA. Caracterización de genes plasmídicos y cromosomales asociados a resistencia a quinolonas en cepas de *E. coli* patógena aviar (APEC).

La colibacilosis aviar causada por *Escherichia coli* patógena aviar (APEC) es considerada como una de las principales causas de morbilidad, mortalidad y decomiso de canal para la industria avícola a nivel mundial. La adquisición de resistencia a las quinolonas en *E. coli* está relacionada con la acumulación de mutaciones cromosomales en los genes *gyrA* y *parC*, así como con la presencia de genes plasmídicos asociados con resistencia a quinolonas. El objetivo de este trabajo fue identificar las bases genéticas de resistencia cromosomal y plasmídica a quinolonas en cepas de APEC aisladas en México. Cuarenta y dos cepas de *E. coli* resistentes a enrofloxacin fueron aisladas de huevo, embrión y pollos de dos empresas avícolas del centro de México, en los años de 1997 y 2005. Se determinó el perfil de resistencia a 19 antimicrobianos, así como la concentración mínima inhibitoria de ciprofloxacina. Se investigó la presencia de mutaciones cromosomales puntuales en los genes *gyrA* y *parC* y de los genes plasmídicos *qnrABS* y *aac(6')-Ib-cr* por medio de PCR y secuenciación. El porcentaje de resistencia a fluoroquinolonas, betalactámicos, monobactámicos y trimetoprim/sulfametoxazol fue alto en las cepas de 2005 (75% a 95%) y 19 (95%) fueron resistentes a 7 o más antimicrobianos. Todas las cepas presentaron una o dos mutaciones en *gyrA* (Ser83Leu y Asp87Asn, Asp87Tyr o Asp87Gly) y una en *parC* (Ser80Ile o Ser80Arg). Dos cepas presentaron una mutación en *parE* (Ser458Ala). Diez cepas fueron positivas al gen silvestre *aac(6')-Ib*, 6 a la variante *aac(6')-Ib-cr* y 6 presentaron ambos genes. No se

detectaron mutaciones en *gyrB* ni la presencia de genes *qnrABS*. Los resultados obtenidos sugieren que estas cepas comparten mecanismos cromosomales de resistencia en común con los descritos previamente por otros investigadores a nivel mundial. Se describe una incidencia del gen plasmídico *aac(6')-Ib-cr* mayor a la descrita en otros estudios similares.

Palabras clave: *Escherichia coli* Patógena Aviar, resistencia, quinolonas, *gyrAB*, *parCE*, *qnrABS*, *aac(6')-Ib-cr*.

ABSTRACT

DEL RÍO ÁVILA CAROLINA. Characterization of plasmid and chromosomal genes associated with quinolone resistance in Avian Pathogenic *E. coli* (APEC) strains.

Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) is considered one of the leading causes of morbidity, mortality and carcass condemnation to the poultry industry worldwide. The acquisition of quinolone resistance in *E. coli* is mainly related to the accumulation of specific chromosomal mutations in the *gyrA* and *parC* genes, as well as to the presence of plasmid mediated quinolone resistance genes. The aim of this study was to identify the genetic basis of chromosomal and plasmid quinolone resistance in APEC strains from Mexico. Forty-two enrofloxacin-resistant *E. coli* strains were isolated from egg, embryos and broilers of two poultry operations in Central Mexico, in 1997 and 2005. The resistance to 19 antibiotics was determined, as well as the minimum inhibitory concentration for ciprofloxacin. The presence of *gyrAB* and *parCE* chromosomal point mutations and the presence of the plasmid genes *qnrABS* and *aac(6')-Ib-cr* were determined by PCR and sequencing. Resistance to fluoroquinolones, betalactams, monobactams and trimethoprim/ sulfamethoxazole was high in the 2005 strains (75% to 95%) and 19 (95%) were resistant to 7 or more antimicrobials. All strains presented one or two *gyrA* mutation (Ser83Leu and Asp87Asn, Asp87Tyr or Asp87Gly) and a *parC* mutation (Ser80Ile or Ser80Arg). Two strains showed a *parE* mutation (Ser458Ala). Ten strains were positive to the *aac(6')-Ib* wild-type gene, 6 strains to the *aac(6')-Ib-cr* variant, and 6 strains possessed both the wild-type and the variant. No *gyrB* mutations or *qnrABS* genes were detected. The present study suggests that these strains share common chromosomal resistance mechanisms with those strains previously described by other

investigators worldwide. A high incidence of the plasmidic gene *aac(6')-Ib-cr* is described in comparison with similar studies.

Key words: Avian Pathogenic *Escherichia coli*, quinolone resistance, *gyrAB*, *parCE*, *qnrABS*, *aac(6')-Ib-cr*.

ABREVIATURAS

A= alanina; AK= amicacina; Ala= alanina; AMP= Ampicilina; APEC= *Escherichia coli* patógena aviar; Arg= arginina; A/S= ampicilina/sulbactam; Asn= Asparagina; Asp= aspartato; AUG= amoxicilina/ácido clavulánico; AZT= aztreonam; BHI= infusión cerebro corazón; Cax= ceftriaxona; CAZ= ceftazidima; Cfx= cefoxitina; CFZ= cefazolina; CIP= ciprofloxacina; CLSI= Clinical and Laboratory Standard Institute; CPE= cefepima; CTX= cefotaxima; D= aspartato; ESBL= β -lactamasas de espectro extendido; ExPEC= *Escherichia coli* patógena extraintestinal; G= glicina; GAT= gatifloxacina; Gln= glutamina; Glu= glutamato; Gly= glicina; GM= gentamicina; His= histidina; I= isoleucina; Ile= isoleucina; Imp= imipenem; ISV= infección del saco vitelino; L= leucina; Leu= leucina; LVX= levofloxacina; Lys= lisina; MF= mayor facilitator; MH= Muller-Hinton; MIC= concentración mínima inhibitoria; MR= multiresistente; N= asparagina; pb= pares de bases; Phe= fenilalanina; PI= piperacilina; PMQR= resistencia a quinolonas mediada por plásmidos; QRDR= región determinante de resistencia a quinolonas; R= arginina; RND= resistance-nodulation division; S= serina; Ser= serina; Thr= treonina; TO= tobramicina; Trp= triptófano; T/S= trimetoprim/sulfametoxazol; Tyr= tirosina; Val= valina; Y= tirosina

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
<i>Escherichia coli</i> patógena aviar (APEC)	1
Descripción y mecanismo de acción de las quinolonas	5
Resistencia a quinolonas	7
Resistencia cromosomal a quinolonas	9
Resistencia a quinolonas mediada por plásmidos	12
Justificación	16
Hipótesis	19
Objetivo general	19
Objetivos específicos	19
MATERIAL Y MÉTODOS	20
Muestras	20
Prueba de susceptibilidad a antimicrobianos	21
Determinación del MIC a ciprofloxacina	22
Extracción de DNA	23
Amplificación de los genes cromosomales <i>gyrAB</i> y <i>parCE</i>	23
Amplificación de los genes plasmídicos <i>qnrABS</i>	24
Purificación de los productos amplificados y secuenciación	24
Amplificación del gen plasmídico <i>aac(6')-Ib-cr</i> aminoglucósido acetiltransferasa	25
RESULTADOS	27
Determinación de la resistencia a 19 antimicrobianos y del MIC a ciprofloxacina	27
Determinación de perfiles plasmídicos	28
Identificación de mutaciones puntuales en los genes <i>gyrAB</i> y <i>parCE</i>	33

Identificación de los genes plasmídicos <i>qnrABS</i>	33
Identificación del gen plasmídico <i>aac(6')-Ib-cr</i> aminoglucósido acetiltransferasa	36
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	51
PERSPECTIVAS	52
REFERENCIAS	53

CUADROS

Cuadro 1. Primers específicos utilizados para la amplificación de los genes <i>gyrAB</i> , <i>parCE</i> , <i>qnrABS</i> y <i>aac(6')-Ib-cr</i> , secuencia, y tamaño del amplicón	26
Cuadro 2. Perfiles de resistencia a antimicrobianos de APEC aisladas en 2005	30
Cuadro 3. Perfiles de resistencia a antimicrobianos de APEC aisladas en 1997	30
Cuadro 4. Mutaciones cromosomales, valores de MIC para ciprofloxacina y determinantes plasmídicos de las cepas de APEC aisladas en 2005	39
Cuadro 5. Mutaciones cromosomales, valores de MIC para ciprofloxacina y determinantes plasmídicos de las cepas de APEC aisladas en 1997	40

FIGURAS

Fig. 1. Número de cepas resistentes y sensibles a 19 antimicrobianos de las 20 cepas de APEC aisladas en 2005	29
Fig. 2. Número de cepas resistentes y sensibles a 19 antimicrobianos de las 22 cepas de APEC aisladas en 1997	29
Fig. 3. Perfil plasmídico de cepas de APEC aisladas en 2005	31
Fig. 4. Perfil plasmídico de cepas de APEC aisladas en 2005 y 1997	31
Fig. 5. Perfil plasmídico de cepas de APEC aisladas en 1997	32
Fig. 6. Perfil plasmídico de X cepas de APEC aisladas en 2005 y 1997 (b)	32
Fig. 7. Amplificación del gen cromosomal <i>gyrA</i> de cepas de APEC	34
Fig. 8. Amplificación del gen cromosomal <i>gyrB</i> de cepas de APEC	34
Fig. 9. Amplificación del gen cromosomal <i>parC</i> de cepas de APEC	35
Fig. 10. Amplificación del gen cromosomal <i>parE</i> de cepas de APEC	35
Fig. 11. Amplificación de los genes <i>qnrABS</i> de cepas control de <i>E. coli</i>	37
Fig. 12. Amplificación del gen plasmídico <i>aac(6')-Ib</i> de cepas de APEC	37
Fig. 13. Amplificación y digestión con la enzima <i>FokI</i> del gen plasmídico <i>aac(6')-Ib</i> de cepas de APEC	38

INTRODUCCIÓN

***Escherichia coli* patógena aviar (APEC)**

Escherichia coli es el principal organismo anaerobio facultativo en el tracto intestinal de mamíferos y aves. El tracto intestinal estéril de los animales recién nacidos se contamina rápidamente con bacterias provenientes de la madre y del medio ambiente.

E. coli se establece principalmente en el intestino grueso y permanece como parte de la flora normal del animal (Gyles y Fairbrother, 2004).

E. coli es un bacilo Gram-negativo, fermentativo, de la familia *Enterobacteriaceae*, que crece en medios simples, selectivos y diferenciales, incluyendo agar MacConkey.

Algunas características que resultan útiles para su identificación incluyen una reacción positiva al indol, pruebas negativas de producción de ureasa y sulfuro de hidrógeno, e incapacidad para utilizar citrato como única fuente de carbono. La serotipificación clásica está basada en el esquema de clasificación de Kauffman, en el cual se determinan los antígenos de superficie O (somático) y H (flagelar), sin embargo, solo un pequeño número de combinaciones O:H están asociadas con enfermedad (Gyles y Fairbrother, 2004).

Las cepas de *E. coli* pueden ser clasificadas en tres grupos: cepas comensales, cepas patógenas intestinales y cepas patógenas extraintestinales. La detección de factores de virulencia que son únicos a un tipo particular de *E. coli* patógena permite la caracterización de estas cepas en diferentes patotipos. Las cepas de *E. coli* patógenas intestinales se dividen en 7 patotipos: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), enteropatogénica (EPEC), enterohemorrágica (EHEC) o productora de toxinas shiga (STEC), *Shigella*/enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC), difuso adherente (DAEC) y adherente invasiva (AIEC) (Croxen *et al.*, 2013). Las cepas de *E. coli*

patógenas extraintestinales (ExPEC) se dividen en 3 patotipos: *E. coli* uropatógena (UPEC), de la meningitis neonatal (NMEC) y patógena aviar (APEC).

Las cepas de ExPEC se diferencian de otros patotipos por la presencia de genes de virulencia que les permiten propagarse sistémicamente en el huésped. Estas cepas, en particular las cepas de APEC, contienen grandes plásmidos, algunos de los cuales codifican factores de virulencia y de resistencia a antimicrobianos, metales pesados y desinfectantes. Johnson *et al.*, (2007) encontraron que los más prevalentes en cepas de APEC son los plásmidos IncFIB, IncFIC, IncFIIA, IncI1, IncP, IncB/O e IncN. A pesar de que varios rasgos de virulencia han sido asociados con *E. coli* causante de enfermedad en aves, el patotipo de APEC aún no se encuentra bien definido. La presencia de plásmidos de diferente naturaleza y sus combinaciones reflejan la diversidad de *E. coli* asociado a enfermedad en aves (Mellata *et al.*, 2010). Rodriguez-Siek *et al.*, (2005) compararon cepas aisladas de aves con colibacilosis con cepas aisladas de muestras fecales de aves aparentemente sanas y encontraron una diferencia altamente significativa en la distribución de ciertos genes. Como conclusión a su trabajo, Rodriguez-Siek *et al.*, (2005) propusieron que un miembro típico del patotipo APEC probablemente contendría *ompT*, que codifica una colicina, varios genes relacionados con el metabolismo del hierro (*iroN*, *iutA*, *sitA*, *fyuA* e *irp2*), así como genes identificados previamente en un plásmido de APEC conocido como pTJ100 (*cvaC*, gen estructural del operon ColV, *iss*, que codifica una proteína de membrana externa que aumenta la supervivencia en suero, y *tsh*, una hemoaglutinina sensible a temperatura). También se han descrito varios tipos de fimbrias en cepas de APEC, incluyendo fimbrias tipo P (F11), tipo 1 (F1), Stg y curli (Nolan *et al.*, 2013). Diferentes asociaciones de genes de virulencia podrían reflejar la existencia de subpatotipos o diferentes patotipos dentro del presente grupo APEC, y

por lo tanto, diferentes mecanismos de virulencia podrían ser empleados por cada subpatotipo (Delicato *et al.*, 2003). Kemmett *et al.*, (2013) compararon aislados de *E. coli* causantes de colibacilosis dentro de una parvada de pollos con aislados intestinales comensales. Los resultados mostraron que varios aislados asociados a colibacilosis contenían pocos o ningún gen comúnmente relacionado con factores de virulencia de APEC. En esencia, tenían el genotipo de “comensales intestinales”. De igual manera, encontraron algunos genes de virulencia en aislados comensales residentes de los intestinos de aves presuntamente sanas. Es posible que cepas de *E. coli* del tracto intestinal formen una reserva de infección potencial, y podrían considerarse oportunistas en un ave huésped comprometido a consecuencia de estrés relacionado con la producción, inmunosupresión o una infección previa.

En el pollo de engorda, las infecciones por APEC se presentan de forma sistémica o localizada incluyendo colisepticemia, coligranuloma, aerosaculitis, síndrome de la cabeza hinchada, celulitis coliforme, salpingitis, peritonitis, pericarditis, perihepatitis e infección del saco vitelino (ISV). A las infecciones causadas entera o parcialmente por APEC se les refiere como colibacilosis (Nolan *et al.*, 2013). La colibacilosis es la enfermedad por infección bacteriana más común en la industria avícola y es considerada como una de las principales causas de morbilidad, mortalidad y decomiso de canal, asociada con grandes pérdidas económicas para la industria avícola a nivel mundial por la mortalidad animal que genera, los costos en tratamientos, disminuciones en la producción y decomiso de canal. La infección ocurre cuando las barreras de la piel o mucosa son comprometidas (rasguños en la piel, daño en las mucosas por infecciones virales, bacterianas o parasitarias, etc.), por inmunosupresión (infecciones virales, toxinas, deficiencias nutricionales) o condiciones ambientales deficientes (mala ventilación de la caseta, inhalación de polvo contaminado con

materia fecal, contaminación del agua y el alimento). La ruta aerogénica de infección es considerada la causa principal de la colibacilosis sistémica o colisepticemia. La infección neonatal de los pollos puede ocurrir de forma horizontal a través del ambiente, o vertical a través de la madre. Una gallina reproductora con salpingitis inducida por APEC, puede infectar el huevo interno antes de la formación del cascarón. La infección antes de la eclosión, causa infecciones del saco vitelino y mortalidad embrionaria. En la infección después de la eclosión, se observa retención del saco vitelino infectado, onfalitis, septicemia y mortalidad de los pollitos de hasta tres semanas de vida (Lutful S, 2010; Nolan *et al.*, 2013).

La industria avícola depende del uso profiláctico y terapéutico de antibióticos como medidas para el control de las enfermedades. En lo referente a la colibacilosis aviar, se usan como medida de control primaria para reducir la morbilidad y la mortalidad. Desafortunadamente, las bacterias como *E. coli* han generado resistencia a los antimicrobianos usados comúnmente. Los patógenos resistentes plantean un grave problema para la avicultura intensiva, ya que pueden perpetuar la enfermedad en la granja, aumentar costos de medicación, además de incrementar la morbilidad y mortalidad.

Uno de los antimicrobianos que suele utilizarse para el control de la colobacilosis es la enrofloxacin, una de las fluoroquinolonas más usada en la industria mexicana de pollo de engorda (Rosario *et al.*, 2005). Las fluoroquinolonas fueron autorizadas para su uso en animales destinados al consumo humano durante la última parte de la década de los ochenta y principios de los noventa (CVMP, 2006). La sarafloxacin y la enrofloxacin fueron aprobadas en 1995 y 1996 en los Estados Unidos para ayudar a controlar la morbilidad y mortalidad asociada a colibacilosis por APEC (Medders *et al.*, 1998). Desde entonces, nuevas moléculas de fluoroquinolonas han sido

autorizadas y están disponibles comercialmente para su uso veterinario alrededor del mundo, lo cual ha sido acompañado por la emergencia de resistencia antimicrobiana en paralelo con su uso en pollos y pavos de consumo (Engberg *et al.*, 2001).

Descripción y mecanismo de acción de las quinolonas

Las quinolonas son una clase importante de agentes antimicrobianos de amplio espectro enteramente sintéticos, y constituyen uno de los agentes antibacterianos más ampliamente prescritos. La primera quinolona, disponible clínicamente en el año de 1962, fue el ácido nalidíxico (Lesher *et al.*, 1962), el cual presentaba poca penetración en los tejidos y fue administrado inicialmente para tratar infecciones del tracto urinario por Gram negativos en humanos y animales (Suh y Lorber, 1995). La evolución de las quinolonas a moléculas más potentes se basó en cambios en las posiciones N-1, C-6, C-7 y C-8 de la estructura química del ácido nalidíxico. Con base en su espectro antimicrobiano, las quinolonas son clasificadas en generaciones. La segunda generación comenzó con fluoroquinolonas obtenidas por fluoridación en la posición C6 de la molécula original. La primera fluoroquinolona, la norfloxacin, fue sintetizada en 1978 y estuvo disponible para uso clínico en 1986 (Paton y Reeves, 1988). La ciprofloxacina, una de las más usadas, fue introducida al mercado en 1987. Las aplicaciones clínicas de estos compuestos se extendieron al tratamiento de infecciones del tracto respiratorio bajo, gastrointestinales, de piel y tejidos blandos y enfermedades de transmisión sexual (Chu, 1996). Para la tercera generación se desarrollaron fluoroquinolonas como la levofloxacina, gatifloxacina y sparfloxacina, más potentes contra bacterias Gram-positivas, particularmente pneumococos, y con actividad significativa contra anaerobios. La cuarta generación, que incluye a la

moxifloxacina y la gemifloxacina, muestra una potente actividad contra anaerobios (Andriole, 2005).

Las quinolonas inhiben la actividad de la DNA girasa y de la topoisomerasa IV, ambas son topoisomerasas tipo II esenciales para la viabilidad de las bacterias. Las topoisomerasas son enzimas que catalizan cambios en la topología del DNA (Bates y Maxwell, 2005) y se dividen en tipo I y tipo II, dependiendo de si catalizan reacciones que envuelven el rompimiento temporal de una (tipo I) o ambas cadenas de DNA (tipo II).

Apesar de estar claramente relacionadas y compartir de 36-40% de homología en la secuencia de aminoácidos, la DNA girasa y la topoisomerasa IV tienen diferentes funciones en la célula. Ambas enzimas permiten que una molécula de DNA de cadena doble pase a través de otra seguido por la religación de la cadena original, catalizando cambios topológicos en el DNA, pero la DNA girasa es única entre las enzimas tipo II porque utiliza energía de la hidrólisis del ATP para introducir superhélices negativas en el DNA (Gellert *et al.*, 1976; Cozzarelli, 1980; Levine *et al.*, 1998). Esta habilidad de la girasa se ha atribuido a la manera única en que la enzima se une al DNA, ya que éste último es envuelto alrededor de la enzima con orientación hacia la derecha (Wang, 1996). De hecho, el modo de enrollamiento del DNA parece ser la principal diferencia entre la girasa y la topoisomerasa IV, lo que contribuye a sus diferencias funcionales. Kampranis y Maxwell (1996) demostraron que Gyr podía ser convertida en una topoisomerasa tipo II convencional, al eliminar la región C terminal del dominio de unión al DNA de la subunidad GyrA.

Las superhélices negativas introducidas por la DNA girasa reducen el número de enlace del DNA, al eliminar las superhélices positivas acumuladas por delante de la horquilla de replicación, facilitando el desenrollamiento de la cadena y el progreso de

los complejos de elongación y transcripción (Reece y Maxwell, 1991), mientras que la función principal de la topoisomerasa IV es promover la decatenación de los cromosomas de las células hijas unidos topológicamente y completar así la replicación (Kato *et al.*, 1990).

Kreuzer y Cozzarelli (1979) demostraron que las quinolonas bloquean la replicación del DNA, no por la privación de DNA girasa a la célula, sino convirtiendo a ésta en un elemento nocivo para la replicación celular. Estas moléculas afectan el equilibrio de ruptura-religación, al atrapar a la enzima en un complejo ternario droga-DNA-enzima durante la reacción de topoisomerización, en la cual el puente de DNA doble está abierto. La formación del complejo ternario es seguida por una rápida inhibición de la síntesis de DNA, cese de crecimiento (acción bacteriostática) y la inducción de la respuesta SOS. Aunque la formación del complejo ternario es crítica para la acción citotóxica de las quinolonas, éste es completamente reversible. Sin embargo, la colisión entre la horquilla de replicación y la topoisomerasa atrapada convierte al complejo ternario en irreversible. Posteriormente la desnaturalización de la enzima resulta en la generación de rupturas de la cadena doble de DNA (Hiasa *et al.*, 1996).

Resistencia a quinolonas

La DNA girasa está comprendida por dos subunidades, A y B, las cuales forman un tetramero A_2B_2 (Klevan y Wang, 1980; Kirchhausen *et al.*, 1985). La subunidad A es codificada por el gen *gyrA* y está envuelta principalmente en la unión al DNA y en la reacción de ruptura y religación de la cadena, mientras que la unidad B es codificada por el gen *gyrB* y exhibe una actividad de ATPasa (Cozzarelli 1980). La topoisomerasa IV es también un heterotetramero formado por dos subunidades A y dos subunidades B, codificadas por los genes *parC* y *parE*, respectivamente (Kato *et*

al., 1990). La adquisición de resistencia a las quinolonas en *E. coli* está relacionada con la acumulación de mutaciones cromosomales puntuales, principalmente en los genes *gyrA* y *parC*, y ocasionalmente se han descrito mutaciones en los genes *gyrB* y *parE*.

También se le ha relacionado con mutaciones causantes de reducción en la acumulación del antimicrobiano, ya sea por una disminución en el consumo, por ejemplo por la disminución de la permeabilidad de las porinas de la membrana externa, en especial la de las proteínas OmpF y OmpC (de *outer membrane protein*) (Harder *et al.*, 1981), o por la sobreexpresión de genes que codifican para bombas denominadas de eflujo o de expulsión activa, como las del sistema AcrAB-TolC, AcrEF-TolC, EmrB y EmrD9 en *E. coli*. Las bombas de eflujo son proteínas transportadoras capaces de expulsar de la célula varios tipos o familias de antibióticos, por lo que también se han denominado bombas de expulsión activa multidroga. Este mecanismo ocurre gracias a la energía de protones, derivada del potencial electroquímico a uno y otro lado de la membrana citoplasmática, o por un sistema relacionado con el ATP. Existen cinco familias de bombas de eflujo: MF (de *major facilitator*), MATE (de *multidrug and toxic efflux*), RND (de *resistance-nodulation-division*), SMR (de *small multidrug resistance*) y ABC (de *ATP binding cassette*) (Webber y Piddock, 2003).

A partir de 1998, se empezó a reportar la emergencia de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (PMQR por sus siglas en inglés), como la codificada por los genes plasmídicos *qnr* y *aac(6')-Ib-cr* aminoglucósido acetiltransferasa y la conferida por las bombas de eflujo codificadas por los genes plasmídicos *qepA* y *oqxAB*.

Resistencia cromosomal a quinolonas

Las mutaciones puntuales reportadas en *E. coli* para el gen *gyrA* asociadas a resistencia a quinolonas se encuentran en la región N-terminal de la proteína, entre los nucleótidos 199 (que corresponde al aminoácido Ala-67 en la proteína) y 318 (que corresponde a Gln-106), los cuales se encuentran cerca del sitio activo de la enzima (Tyr-122). A esta región se le conoce como “región determinante de resistencia a quinolonas” o QRDR por sus siglas en inglés (Yoshida 1990). La QRDR para el gen *parC* se encuentra entre los aminoácidos Lys-49 y Thr-170 (Vila *et al.*, 1996).

Una sola mutación puntual en *gyrA* puede ser suficiente para causar altos niveles de resistencia a ácido nalidíxico, pero es necesario que se presenten mutaciones adicionales de manera ordenada o escalonada para que se generen altos niveles de resistencia a fluoroquinolonas. En general, una sustitución en GyrA está asociada con un nivel muy bajo de resistencia a ciprofloxacina con una concentración mínima inhibitoria (MIC) entre 0.125 y 0.25 µg/ml; dos cambios, uno en GyrA y uno en ParC, están asociados con un nivel moderado de resistencia a ciprofloxacina (MIC 1-4 µg/ml); tres sustituciones, dos en GyrA y una en ParC, se asocian a un nivel alto de resistencia (MIC 4-64 µg/ml); y cuatro cambios, dos en GyrA y dos en ParC, están relacionados con el nivel más alto de resistencia (MIC 64-128 µg/ml) (Vila *et al.*, 1996, Bagel *et al.*, 1999). La girasa, inicialmente más susceptible a las quinolonas que la topoisomerasa IV, es la enzima blanco para ser modificada primero. Posteriormente, la topoisomerasa IV silvestre, que es más susceptible que la versión mutada de la girasa, es modificada (Heisig, 1996). En un estudio con ocho especies de *Enterobacteriaceae*, *E. coli* fue la única especie que requirió dos mutaciones en *gyrA* para presentar altos niveles de resistencia a fluoroquinolonas (Weigel *et al.*, 1998). Se ha demostrado que una cepa de *E. coli* que posee una mutación en la región de los

genes *parC* o *parE* requiere mutaciones adicionales en *gyrA* para expresar resistencia a fluoroquinolonas (Breines *et al.*, 1997). Las mutaciones más importantes en el desarrollo del fenotipo de resistencia a fluoroquinolonas en *E. coli* son, para el gen *gyrA*, la de los aminoácidos Ser-83 a Leu y Asp-87 a Asn y para el gen *parC*, Ser-80-Ile. Las sustituciones en el codón 83 de GyrA son las más comunes en cepas de *E. coli* de origen clínico humano, veterinario y de laboratorio. Las cepas que presentan solo esta sustitución son significativamente más resistentes a fluoroquinolonas que aquellas que solo presentan una mutación puntual en Asp-87, lo que podría explicar la alta prevalencia de mutaciones en Ser-83 (Bagel *et al.*, 1999). Por su parte, las mutaciones en estos dos codones confieren niveles más altos de resistencia a quinolonas que las mutaciones en otros codones dentro de la QRDR (Yoshida *et al.*, 1990).

En los experimentos de Willmott y Maxwell (1993), la unión de norfloxacin se redujo significativamente para los complejos formados con GyrA_{Trp83} y DNA, en comparación con los complejos formados por la enzima silvestre y DNA. En cambio, Hiasa y Shea (2000) demostraron que la estabilidad del complejo ternario enzima-quinolona-DNA determina si la colisión entre la horquilla de replicación y el complejo ternario resultará en la inhibición de la replicación del DNA, y propusieron la hipótesis de que las mutaciones en GyrA y Topo IV podrían afectar la estabilidad del complejo ternario sin alterar la probabilidad de formación de este último. En este escenario, los complejos ternarios formados con la enzima mutante no son suficientemente estables para arrestar el avance de la horquilla de replicación.

Nakamura *et al.*, (1989) estudiaron la proporción de mutaciones de *gyrA* y *gyrB* entre mutantes espontáneas resistentes a quinolonas de *E. coli* KL16 seleccionadas por ácido nalidíxico. A partir de 20 mutantes seleccionadas, 10 presentaron mutaciones en

gyrA y 10 presentaron mutaciones en *gyrB*. Algunas de las mutantes en *gyrA* exhibieron MICs elevados de ácido nalidíxico (200 a ≥ 400 $\mu\text{g/ml}$), mientras que la mayoría de las mutantes en *gyrB* presentaron MICs relativamente bajos para ácido nalidíxico (25 a 50 $\mu\text{g/ml}$), y ninguna mostró MICs tan altos como 200 a ≥ 400 $\mu\text{g/ml}$. En cambio, de ocho aislamientos clínicos, cinco presentaron mutaciones en *gyrA* y solo uno presentó mutación en *gyrB*. Las cinco mutantes *gyrA* mostraron MICs elevados para ácido nalidíxico (200 a ≥ 400 $\mu\text{g/ml}$), mientras que el de la mutante *gyrB* fue relativamente bajo (100 $\mu\text{g/ml}$). Estos resultados demuestran que la frecuencia de mutaciones espontáneas es prácticamente la misma para ambos genes, *gyrA* y *gyrB*. El porqué se presentan mayor número de mutantes *gyrA* en aislados clínicos puede ser debido a que éstas son más resistentes a quinolonas que las mutantes *gyrB* y por lo tanto presentan ventaja selectiva. La QRDR para GyrB se encuentra entre los aminoácidos 420 al 450. Las mutaciones más comunes para el gen *gyrB* son Asp-426-Asn y Lys-447-Glu, aunque esta última mutación genera resistencia únicamente a quinolonas ácidas e hipersusceptibilidad a quinolonas anfotéricas (Yoshida *et al.*, 1991).

Para *parE*, se han reportado mutaciones puntuales entre los aminoácidos 416 al 464, y una mutación en el aminoácido 529 para un aislado de humano (Hopkins *et al.*, 2005; Uchida *et al.*, 2010).

El primer estudio realizado en aves para identificar las mutaciones cromosomales asociadas con resistencia fenotípica a quinolonas se realizó en Georgia, Estados Unidos, en el año 2000 (White *et al.*, 2000), e incluyó 535 aislamientos de *E. coli* de casos clínicos de colibacilosis durante el periodo de 1996 a 1999. Posteriormente se realizaron otros estudios en Estados Unidos (norte de Georgia y Arkansas), Francia, España, Italia, China y Corea (Giraud *et al.*, 2001; Sáenz *et al.*, 2003; Yang *et al.*,

2004; Khan *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005; Tae-Eun *et al.*, 2007; Vanni *et al.*, 2014), donde se identificaron mutaciones puntuales en los genes *gyrAB* y *parCE* en aislados obtenidos de pollinaza, de canal y de pollos y pavos aparentemente sanos y con colibacilosis. Para el gen *gyrA* en aves se han reportado las mutaciones Ser83Leu/Ile/Asp y Asp87Tyr/Gly/Asn/Ala/His, para el gen *gyrB* se han reportado Asp426Thr y Glu466Asp, para el gen *parC* se han reportado Ser80Ile/Arg/Phe/Asp, Glu84Val/Lys/Ile/Gly/Tyr, Ala108Val y Asn91-Ser y finalmente, en un estudio que no distingue entre aislados de aves y cerdos, se reportaron para el gen *parE* las mutaciones Ser458Ala y Asn463Asp.

Resistencia a quinolonas mediada por plásmidos

La diseminación de la resistencia a quinolonas mediada por genes plasmídicos se debe más a la transmisión de plásmidos exitosos por conjugación que a una diseminación por clonas bacterianas específicas. A pesar de que los determinantes PMQR confieren solamente niveles bajos de resistencia a quinolonas, la participación significativa de éstos se basa en el aseguramiento de que la bacteria sobreviva y subsecuentemente genere las mutaciones cromosomales puntuales necesarias para adquirir altos niveles de resistencia (Poirel *et al.*, 2008). El primer determinante PMQR, la proteína Qnr (de *quinolone resistance*), fue descubierto en una cepa de *Klebsiella pneumoniae* a partir de un cultivo de orina de un paciente en Alabama en 1994 (Martínez-Martínez *et al.*, 1998). Las proteínas Qnr pertenecen a la familia de repeticiones pentapéptido, que incluye a otros dos miembros, McbG y MfpA, que también confieren resistencia a inhibidores de la girasa. Estas proteínas están formadas por secuencias de aminoácidos repetidas en tandem con una secuencia consenso (Vetting *et al.*, 2006). La proteína QnrA1 purificada es capaz de unirse a las

subunidades de la DNA girasa y de la topoisomerasa IV (Tran *et al.*, 2005a; Tran *et al.*, 2005b). Es posible que gracias a su semejanza estructural en 3-D con el DNA, QnrA1 reduzca la cantidad de complejos binarios enzima-DNA, los blancos moleculares de la inhibición por quinolonas, al competir con el DNA por la unión a la DNA girasa y la topoisomerasa IV (Cattoir y Nordmann 2009). Hasta el momento se han identificado seis diferentes familias *qnr*, cada una con diferente número de alelos (*qnrA1-7*, *qnrB1-80*, *qnrC*, *qnrD1-2*, *qnrS1-9* y *qnrVC1-7*) (actualizaciones en <http://www.lahey.org/qnrstudies>) (Jacoby *et al.*, 2008). En aves, la prevalencia de los genes *qnrB* y *qnrS* en *E. coli* parece ser mayor que la de *qnrA* y *qnrD*, mientras que no se ha identificado ninguna variante *qnrC*. La variante *qnrVC* aún no ha sido caracterizada en aves. Varios estudios epidemiológicos han mostrado que los aislados de enterobacterias positivos a Qnr expresan también beta lactamasas de espectro extendido (ESBLs) codificadas por plásmidos, especialmente aquellos que expresan determinantes QnrA y QnrB. Además, los plásmidos positivos a *qnrA* y *qnrB* a menudo contienen genes que confieren resistencia a aminoglucósidos, tetraciclinas, sulfonamidas, trimetoprim y rifampicina (Cattoir y Nordmann, 2009).

Recientemente, tres nuevos determinantes PMQR fueron descubiertos. La variante *cr* (de *ciprofloxacin resistance*) del gen *aac(6')-Ib* aminoglucósido acetil transferasa, fue descubierta en un aislamiento de *E. coli* en Shangai, China (Robicsek *et al.*, 2006a). Esta determinante se considera responsable de conferir resistencia a kanamicina, tobramicina, amicacina y reducción de la susceptibilidad a ciprofloxacina por N-acetilación de su grupo amino piperazinil. Esta variante presenta dos cambios en la secuencia de aminoácidos, Trp102Arg y Asp179Tyr, los cuales son necesarios y suficientes para conferir susceptibilidad reducida a varias fluoroquinolonas. Cuando en una misma bacteria se presentan tanto *qnrA* como *aac(6')-Ib-cr*, el nivel de

resistencia a ciprofloxacina incrementa cuatro veces más que el conferido cuando solo se presenta *qnrA* (Robicsek *et al.*, 2006a).

Las bombas de eflujo OqxAB y QepA constituyen los últimos descubrimientos de genes PMQR. OqxAB es codificado por los genes *oqxA* y *oqxB* en el mismo operón. OqxA y OqxB consisten de varios bloques conservados de aminoácidos similares a otras proteínas verificadas y posiblemente pertenecientes a la familia RND. De manera similar a otros miembros de esta familia, el sistema de eflujo OqxAB también requiere de la proteína TolC para formar el canal transmembranal. OqxAB fue inicialmente reportado como mecanismo de resistencia al promotor de crecimiento para cerdos olaquinox (Hansen *et al.*, 2004). No fue reconocido como PMQR hasta recientemente, y los datos en la prevalencia y epidemiología son limitados comparados a los observados para otros determinantes PMQR.

La proteína QepA comparte identidad significativa con las bombas de eflujo pertenecientes a la familia MF de transportadores dependientes de protones, y fue identificada en la cepa *E. coli* C316 en Japón (Yamane 2007). Esta proteína confiere baja susceptibilidad a quinolonas hidrofílicas como la ciprofloxacina, norfloxacina y enrofloxacina. Se ha sugerido la posibilidad de una fuerte relación entre los genes *qepA* y *rmtB*, que confiere resistencia a todos los aminoglucósidos, excepto estreptomicina. QepA ha mostrado similitudes considerables con los transportadores pertenecientes a la familia 14-segmento-transmembranal de actinomicetes ambientales. Desde su descubrimiento se ha encontrado una variante de *qepA* que posee dos substituciones de aminoácidos y fue nombrada QepA2 (Cattoir *et al.*, 2008).

El primer estudio de caracterización de genes PMQR en aves se realizó en China con aislamientos del 2002 obtenidos de 25 pollos de engorda (Yue *et al.*, 2008). En este

estudio se identificaron los genes *oqxAB* en 3 aislamientos y *qnrS1* en un aislamiento. Se han publicado estudios de muestras de canal, pollos, pavos, patos, gansos y perdices aparentemente sanos y con colibacilosis de Ecuador, China, Japón, Corea del Sur, Nigeria, Egipto, Túnez y varios países de Europa (Huang *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2009; Cerquetti *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010; Kmet y Kmetová, 2010; Fortini *et al.*, 2011; Veldman *et al.*, 2011; Tamang *et al.*, 2012; Gosling *et al.*, 2012; Kawanishi *et al.*, 2013; Ahmed *et al.*, 2013; Randall *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2014; Kilani *et al.*, 2015; Armas-Freire *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015; Oh *et al.*, 2016). En Ecuador se reportó la presencia del gen plasmídico *qnrS-*, en China se reportaron *qnrA-*, *qnrB-*, *qnrB6*, *qnrS-*, *qnrS1*, *aac(6')-Ib-cr*, *oqxA* y *qepA*, en Japón se reportó un aislamiento con *aac(6')-Ib-cr*, en Corea del Sur *qnrB4*, *qnrB19*, *qnrB44*, *qnrS-*, *qnrS1*, *aac(6')-Ib-cr* y *qepA*, en Nigeria *qnrB10*, *qnrB19*, *qnrS1* y *qepA1*, en Egipto *qnrA1*, *qnrB2* *qnrS1* y *aac(6')-Ib-cr*, en Túnez *qnrB1* y *qnrS1* y en Europa (Italia, Polonia, Holanda, Reino Unido y Eslovaquia) *qnrB-*, *qnrB19*, *qnrS-*, *qnrS1* y *aac(6')-Ib-cr*. China ha reportado el mayor número de aislamientos positivos a PMQR.

En estudios realizados en muestras de aves silvestres, 9 aislamientos de *E. coli* positivos a *qnrS-* y uno positivo a *aac(6')-Ib-cr* fueron obtenidos entre 2008 y 2009 de muestras de heces de las costas polacas del mar Báltico (Literak *et al.*, 2010). Seis aislamientos positivos a *aac(6')-Ib-cr* y dos a *qnrS1* fueron obtenidos de seis aves gran cormorán (*Phalacrocorax carbo*) y diecisiete aislamientos positivos a *qnrS1* fueron obtenidos de diecisiete ánades reales (*Anas platyrhynchos*) en Eslovaquia durante 2006 y 2009, de un total de 500 cormoranes y 300 ánades. Ambos son aves acuáticas comunes en Europa Central, y por lo tanto, la detección de genes PMQR en estas aves silvestres puede indicar una rápida diseminación de estos genes en el medio

ambiente. Los genes *qnrSI* fueron localizados en plásmidos transferibles (Tausova *et al.*, 2012).

Justificación

La industria avícola nacional ha mantenido un crecimiento constante en los últimos años, consolidándose como una actividad estratégica para el país, tanto en el ámbito alimentario como económico. En el año 2015, se produjeron más de 3 millones de toneladas de pollo en México, situando a nuestro país como el 7º en producción de pollo a nivel mundial. La avicultura representa el 63.6% de la producción pecuaria del país (34.7% pollo y 28.8% huevo) y genera más de 1 millón de empleos directos e indirectos (UNA, 2016). La relevancia de esta actividad pecuaria en nuestro país acentúa la importancia de realizar proyectos de investigación que generen información que le sea de beneficio a corto, mediano y largo plazo. En el caso de las aves, *E. coli* tiene gran importancia por ser uno de los patógenos bacterianos que se aísla con mayor frecuencia, además de ser considerado como responsable de al menos 5% de la mortalidad en las parvadas comerciales, por lo que ocasiona grandes pérdidas económicas en la industria avícola. En los Estados Unidos se calcula que éstas pueden sobrepasar los cien millones de dólares anuales (Martínez y Rosario, 2012). La importancia de las infecciones causadas por coliformes radica en una reducción de la incubabilidad, aumento de los costos de medicación, número de pollos desechados y mortalidad, así como retraso en el crecimiento y secuelas como artritis. Tradicionalmente, estas infecciones se han controlado mediante el uso de antimicrobianos, pero la resistencia de *E. coli* a estos dificulta su control.

Cuando las fluoroquinolonas fueron introducidas al mercado en 1987, algunos expertos predijeron que el desarrollo de resistencia contra estos inhibidores de la

girasa era improbable, ya que al menos dos mutaciones serían requeridas para generar un fenotipo significativamente resistente. Incluso se sugirió que la presentación de transmisión horizontal de resistencia a las fluoroquinolonas era muy poco probable. A pesar de esto, la resistencia ha emergido de forma independiente, incontables veces, entre múltiples serogrupos y ambientes genéticos diferentes, y a nivel global. Genes cromosomales y plasmídicos que no son nativos de las *Enterobacteriaceae* han sido adquiridos por este género para efecto de protección a las topoisomerasas y eflujo de quinolonas. La incidencia de genes asociados a resistencia a quinolonas mediada por plásmidos ha aumentado en años recientes, y junto con ellos ha aumentado la incidencia de mutaciones en los genes cromosomales (*gyrAB* y *parCE*), mientras que aislados que no presentan PMQR permanecen estables, por lo que se ha establecido como hipótesis que los determinantes PMQR facilitan la emergencia de estas mutaciones en presencia de quinolonas a niveles terapéuticos. Aunado a esto, facilitan su co-selección con otros elementos de resistencia a distintos antimicrobianos, principalmente con beta-lactamasas de amplio espectro (ESBLs), las cuales han presentado prevalencias más altas en cepas resistentes a quinolonas.

La resistencia a quinolonas está presente en todos los continentes y en casi todos los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* de importancia clínica (*E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Proteus*) y varios estudios han reportado incremento en la prevalencia de resistencia a quinolonas en esta familia de manera significativa y continua.

La posibilidad de transferencia de genes de resistencia a antibióticos entre humanos, animales y el ambiente también es una amenaza que indica la necesidad de realizar investigación acerca de mecanismos emergentes de resistencia y de establecer

estrictas medidas de control en el uso prudente de antimicrobianos en animales y humanos.

Entender la manera en que funciona la resistencia a fluoroquinolonas a nivel molecular abre la posibilidad de controlarla y tomar decisiones más acertadas en las granjas. Sin embargo, son pocos los estudios que han buscado caracterizar las mutaciones cromosomales y los genes plasmídicos asociados a resistencia a quinolonas en APEC en México y América Latina. En América Latina, Armas-Freire *et al.*, (2015) publicaron un estudio que incluía la identificación del gen plasmídico *qnrB* en cepas de *E. coli* resistentes a fluoroquinolonas, aisladas de aves de engorda de comunidades rurales y de industria en Ecuador, pero en general, los trabajos publicados se centran en la caracterización de resistencia fenotípica a antimicrobianos. En este sentido, se han descrito caracterizaciones de aislados de *E. coli* de pollos sanos en Chile, de gallinas ponedoras en Argentina, de hígado y canal de pollo en Brasil, así como de huevo, embrión y pollos con ISV en México (Rosario *et al.*, 2005; San Martín *et al.*, 2005; Pantozzi *et al.*, 2010; Lima-Filho *et al.*, 2013; Koga *et al.*, 2015), pero ninguno se ha enfocado en la caracterización genotípica de la resistencia. Estos antecedentes demuestran la importancia de una propuesta para caracterizar molecularmente las bases de la resistencia a quinolonas en cepas de APEC en México, que incluya las mutaciones puntuales dentro de la QRDR de los genes cromosomales *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*, así como la identificación de genes plasmídicos PMQR y comparar los resultados con los obtenidos en otras partes del mundo.

Hipótesis

Los aislamientos de APEC con resistencia fenotípica a fluoroquinolonas mostrarán al menos una mutación puntual en los genes cromosomales *gyrA* y *parC*, y en menor frecuencia en los genes *gyrB* y *parE*, así como la presencia de los genes plasmídicos asociados a resistencia a quinolonas *qnrABS* y *aac(6')-Ib-cr* aminoglucósido acetiltransferasa.

Objetivo general

Identificar las bases genéticas de la resistencia cromosomal y plasmídica a fluoroquinolonas en cepas de APEC aisladas de dos empresas avícolas del centro de México.

Objetivos específicos

- 1- Determinar el MIC a ciprofloxacina y el perfil de resistencia a 19 antimicrobianos en cepas de APEC de 2 empresas avícolas del centro de México.
- 2- Identificar mutaciones puntuales dentro de la QRDR de los genes cromosomales *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*.
- 3- Identificar la presencia de plásmidos mediante la obtención del perfil plasmídico.
- 4- Identificar la presencia de los genes PMQR *qnrABS* y *aac(6')-Ib-cr* aminoglucósido acetiltransferasa.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras

42 cepas de APEC que pertenecen a dos colecciones de 267 y 97 aislados, respectivamente (Rosario *et al.*, 2004; Ramírez-Barrera, 2007), fueron obtenidas del Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Todas las muestras fueron aisladas de las granjas reproductoras, incubadoras y granjas de pollo de engorda de dos empresas integradas del centro de México, en los años de 1997 y 2005, respectivamente. Todas las cepas habían sido previamente identificadas, serotipificadas y analizadas para la identificación de perfiles de resistencia a ciertos antimicrobianos y de genes de virulencia. Para el presente trabajo, se eligieron cepas previamente clasificadas como resistentes a enrofloxacin.

Se analizaron 22 cepas del año 1997 que corresponden a huevo fértil, huevo infértil de 19 a 21 días de incubación e hígado y saco vitelino de embrión de huevo picado (21 días de incubación), así como hígado y saco vitelino de pollos de engorda con ISV que murieron durante la primera semana de vida. También se analizaron 20 cepas del año 2005 que corresponden a huevo fértil, huevo bomba, hígado/pulmón, saco vitelino o médula ósea de embrión de huevo picado, pollito de primera y segunda calidad y pollo de engorda de 2.1, 2.4 y 5.2 semanas de vida que murieron por ISV.

Los aislamientos se obtuvieron de cultivos conservados en caldo infusión cerebro corazón (BHI) adicionado con 10% de glicerol a -80°C. Se resembraron en agar MacConkey y posteriormente en agar soya tripticaseína (TSA).

Prueba de susceptibilidad a antimicrobianos

Para realizar la determinación de susceptibilidad a antimicrobianos se utilizó el sistema automatizado MicroScan WalkAway 96 plus de SIEMENS. Este sistema se basa en el ensayo de dilución en caldo. Los paneles utilizan concentraciones equivalentes a los puntos de corte interpretativos del Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) de los Estados Unidos. Los 19 antimicrobianos probados incluyen fluoroquinolonas: ciprofloxacina (CIP), gatifloxacina (GAT) y levofloxacina (LVX); penicilinas: ampicilina (AMP) y piperacilina (PI); penicilinas asociadas a inhibidores de las betalactamasas: amoxicilina/ácido clavulánico (AUG) y ampicilina/sulbactam (A/S); cefalosporinas de primera y segunda generación: cefazolina (CFZ) y cefoxitina (Cfx); cefalosporinas de tercera y cuarta generación: cefotaxima (CTX), ceftriaxona (Cax), ceftazidima (CAZ) y cefepima (CPE); monobactámicos: aztreonam (AZT); carbapenems: imipenem (Imp); aminoglucósidos: gentamicina (GM), tobramicina (TO) y amikacina (AK); y trimetoprim/sulfametoxazol (T/S). Los paneles del sistema MicroScan también incluyen pruebas para la identificación bioquímica de los microorganismos como fermentación de glucosa, sucrosa, sorbitol, rafinosa, ramnosa, arabinosa, inositol, adonitol y melibiosa, producción de ureasa, H₂S e indol, descarboxilación de lisina, arginina, ornitina, triptófano y esculina, VP y ONPG.

Los aislamientos fueron resembrados en TSA e incubados a 37°C por 24 h. El sistema automatizado de MicroScan utiliza un equipo de inoculación que estandariza el inóculo a 0.5 de escala de turbidez de McFarland en 30 ml de diluyente, que posteriormente fueron vaciados en la bandeja de sembrado. Por medio del sistema rehidratante/inoculador se inocularon los paneles para organismos Gram negativos y se incubaron a 35°C por 24 hs. Los resultados se leyeron por medio del sistema automatizado AutoSCAN.

Determinación del MIC a ciprofloxacina

La concentración mínima inhibitoria (MIC) se define como la concentración más baja (en mg l^{-1}) del agente antimicrobiano que previene el crecimiento visible de un microorganismo bajo condiciones definidas (Wiegand *et al.*, 2008). En la práctica clínica, este parámetro *in vitro* es utilizado para clasificar al organismo estudiado como clínicamente susceptible, intermedio o resistente al antimicrobiano probado. Los estándares de interpretación para estas clasificaciones son publicados por organizaciones como el CLSI (2012) de los Estados Unidos. Se preparó un stock de 2560 mg/ml de ciprofloxacina de acuerdo a las especificaciones del CLSI, y se realizaron las siguientes diluciones seriadas en caldo Muller-Hinton (MH): 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312, 0.0156, 0.0078, 0.0039 y 0.0019 microgramos/mililitro. En cajas de Elisa de fondo redondo con tapa de 96 pozos, se colocó en cada columna una dilución a ensayar, dejando la primera columna con 50 ml de antimicrobiano sin caldo MH y la última con 50 ml de caldo MH sin antimicrobiano, como control. Se preparó el inóculo de las bacterias a una concentración de 0.5 de McFarland (en espectrofotómetro a 625 nm, a una observancia de 0.08-0.135). Del inóculo anterior, se realizó una dilución 1:100 en caldo MH y se colocaron 100 microlitros en los pozos de las cajas de Elisa con las diluciones del antimicrobiano y los controles. Después de la incubación, la presencia de turbidez o sedimento indica el crecimiento del organismo. Los MICs fueron interpretados de acuerdo a los lineamientos del CLSI M100-S17. Se utilizó la cepa *E. coli* ATCC 25922 como referencia para las pruebas de susceptibilidad.

Extracción de DNA

Para la extracción de DNA cromosomal, las cepas fueron cultivadas en caldo BHI con agitación orbital (150 rpm) durante 18 h y se realizó la técnica de extracción con tiocinato de guanidina. Los cultivos se centrifugaron 10 min a 13,000 rpm y se dejó secar el pellet obtenido. Se agregaron 550 µl de solución de lisis (tiocinato de guanidina 5 M, EDTA 0.5 M y sarcosil 0.5% P/V) y se mezcló vigorosamente por 5 min. Posteriormente se agregó 250 µl de acetato de amonio 7.4 M frío y 500 µl de cloroformo-isoamilalcohol (24:1 v/v), y se mezcló por 3 min, centrifugándose por 5 minutos a 10,000 rpm. Se recogió el sobrenadante, se adicionó isopropanol al 100% hasta 1.5 ml y se agitó hasta observar hebras de DNA. Se extrajo el DNA con una punta de plástico y se lavó tres veces con etanol al 70%. El DNA seco se resuspendió en 100 µl de agua estéril.

Para la extracción de DNA plasmídico las cepas fueron cultivadas en caldo BHI con agitación orbital (150 rpm) durante 18 h en 5 ml de caldo BHI, posteriormente el cultivo fue centrifugado por 10 min y la pastilla bacteriana obtenida se dejó secar. La extracción de plásmidos se realizó mediante el sistema QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Ventura CA. USA), que utiliza el método de lisis alcalina y un sistema de columnas de afinidad.

Amplificación de los genes cromosomales *gyrAB* y *parCE*

En el cuadro 1 se muestran las secuencias de cada primer utilizado para la amplificación por medio de PCR de los genes *gyrAB* y *parCE*, tamaño del producto obtenido y las referencias de donde se obtuvieron. Las condiciones de amplificación fueron: 33 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30s, alineación a 57°C para *gyrA*,

61°C para *gyrB*, 58°C para *parC* y 63°C para *parE* por 30s y extensión a 72°C por 30s.

Los productos de amplificación fueron visualizados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, y digitalizados utilizando el programa GelLogic 2000.

Amplificación de los genes plasmídicos *qnrABS*

En el cuadro 1 se muestran las secuencias de cada primer utilizado para la amplificación por medio de PCR de los genes plasmídicos *qnrABS*, tamaño del producto obtenido y referencias de donde se obtuvieron. Las condiciones de amplificación fueron: 33 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30s, alineación a 54.5°C para *qnrA* y 53°C para *qnrB* y *qnrS* por 35s y extensión a 72°C por 30s. Los productos de amplificación fueron visualizados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, y digitalizados utilizando el programa GelLogic 2000. Como control se utilizaron las cepas *E. coli* 580 para *qnrA*, *E. coli* 264 para *qnrB* y *E. coli* 428 para *qnrS* que fueron compartidas por el Instituto Nacional de Salud Pública de Cuernavaca, Morelos.

Purificación de los productos amplificados y secuenciación

Para remover los primers y los nucleótidos libres, los productos obtenidos por PCR fueron purificados utilizando el sistema comercial QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Ventura CA, USA). Los productos purificados fueron directamente procesados para ser secuenciados en ambos sentidos mediante el método Taq FS Dye Terminator Cycle Fluorescence-Based Sequencing, utilizando el equipo Applied Biosystems Modelo 3730. Las secuencias de ambas cadenas de los productos de PCR

fueron alineadas por medio del programa Vector NTI para obtener una secuencia consenso de nucleótidos y posteriormente, la secuencia deducida de aminoácidos. Ambas secuencias, de nucleótidos y de aminoácidos, fueron alineadas y comparadas con diversas secuencias de *E. coli* depositadas en la base de datos del GenBank del NCBI utilizando los programas BLASTn y BLASTx para buscar la homología, identificar mutaciones puntuales de nucleótidos y cambios en la secuencia de aminoácidos de los genes *gyrAB* y *parCE*, y determinar la variante genética de los genes *qnrABS*.

Amplificación del gen plasmídico *aac(6')-Ib-cr* aminoglucósido acetiltransferasa

En el cuadro 1 se muestran las secuencias de cada primer utilizado para la amplificación por medio de PCR del gen plasmídico *aac(6')-Ib-cr*, tamaño del producto obtenido y referencia de donde se obtuvieron. Las condiciones de PCR fueron: 34 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30s, alineación a 60.5°C por 30s, y extensión a 72°C por 30s. Para diferenciar entre el gen *aac(6')-Ib* silvestre y la variante *cr*, a cada amplificado positivo se le realizó una digestión utilizando la enzima de restricción *FokI* a 37°C por 2 h. La variante *cr* de *aac(6')-Ib* presenta dos mutaciones, Trp-102-Arg y Asp-179-Tyr, las cuales son necesarias y suficientes para conferir a la enzima la habilidad de acetilar a la ciprofloxacina. El gen silvestre presenta un sitio de corte para la enzima de restricción *FokI*, dando como resultado dos bandas de 272-pb y 210-pb posterior a la digestión con la enzima. La mutación presente en el codón 102 de la variante *cr*, hace que ésta pierda dicho sitio de corte, y solo se presente una banda de 482-pb posterior a la digestión con la enzima. Los productos de amplificación fueron visualizados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, y digitalizados utilizando el programa

GelLogic 2000. Como control se utilizó una cepa de *E. coli* positiva a *aac(6')-Ib-cr* que fue compartida por el Instituto Nacional de Salud Pública de Cuernavaca, Morelos (Silva-Sánchez *et al.*, 2011).

Cuadro 1. Primers específicos utilizados para la amplificación de los genes *gyrAB*, *parCE*, *qnrABS* y *aac(6')-Ib-cr*, secuencia y tamaño del amplicón.

Primer	Secuencia	Tamaño del producto	Referencia
<i>gyrAf</i> <i>gyrAr</i>	5'-AAATCTGCCCGTGTTCGTTGGT-3' 5'-GCCATACCTACGGCGATACC-3'	344-pb	Rodríguez-Martínez <i>et al.</i> , 2006
<i>gyrBf</i> <i>gyrBr</i>	5'-CTCCTCCCAGACCAAAGACA-3' 5'-TCACGACCGATACCACAGC-3'	447-pb	Morgan-Linnell <i>et al.</i> , 2009
<i>parCf</i> <i>parCr</i>	5'-CTGAATGCCAGCGCCAAATT-3' 5'-GCGAACGATTTCCGGATCGTC-3'	188-pb	Rodríguez-Martínez <i>et al.</i> , 2006
<i>parEf</i> <i>parEr</i>	5'-GCCTGGCAAACCTGGCTGATGTA-3' 5'-GATCAATACGGTAGAGCGGTGGC-3'	401-pb	Morgan-Linnell <i>et al.</i> , 2009
<i>qnrAf</i> <i>qnrAr</i>	5-ATTTCTCACGCCAGGATTTG-3 5-GATCGGCAAAGGTTAGGTCA-3	515-pb	Robicsek <i>et al.</i> , 2006b
<i>qnrBf</i> <i>qnrBr</i>	5-GATCGTGAAAGCCAGAAAGG-3 5-ATGAGCAACGATGCCTGGTA-3	469-pb	Robicsek <i>et al.</i> , 2006b
<i>qnrSf</i> <i>qnrSr</i>	5-GCAAGTTCATTGAACAGGGT-3 5-TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG-3	428-pb	Cattoir <i>et al.</i> , 2007
<i>aac(6')-Ib-crf</i> <i>aac(6')-Ib-err</i>	5'-TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA-3' 5'-CTCGAATGCCTGGCGTGT-3'	482-pb	Park <i>et al.</i> , 2006

RESULTADOS

Determinación de la resistencia a 19 antimicrobianos y del MIC a ciprofloxacina

Las cepas de 2005 mostraron mayor porcentaje de resistencia comparadas con las de 1997. De las 20 cepas aisladas en 2005, se encontraron altos niveles de resistencia a CIP (100%), AMP (95%), PI (95%), GAT (95%), LVX (95%), A/S (90%), CFZ (85%), AUG (80%), CTX (80%), Cax (80%), CAZ (80%), CPE (80%), AZT (80%), T/S (80%) y Cfx (75%). También se presentó resistencia a TO (35%) y GM (20%). Todas las cepas fueron sensibles a AK e Imp (Fig. 1). 17 cepas (85%) presentaron resistencia a 3 o más categorías de antimicrobianos y fueron designadas como multiresistentes (MDR), mientras que 2 cepas (10%) presentaron resistencia a todas las categorías de antimicrobianos con excepción de 2 o menos y fueron designadas como extensamente resistentes (XDR) (Magiorakos *et al.*, 2011). La combinación MDR más común (10 cepas, 50%) fue la de resistencia a CIP, GAT, LVX, AMP, PI, AUG, A/S, CFZ, Cfx, CTX, Cax, CAZ, CPE, AZT y T/S (Cuadro 2).

De las 22 cepas de 1997, se presentaron niveles altos de resistencia únicamente a las fluoroquinolonas, CIP (100%), LVX (100%) y GAT (86%). También se presentaron niveles más bajos de resistencia a PI (41%), AMP (27%), A/S (23%), T/S (23%) y AUG (4%) (Fig. 2). Solo 6 cepas (27%) fueron designadas como multiresistentes. La combinación multiresistente más común (3 cepas, 14%) fue la de resistencia a CIP, GAT, LVX, AMP, PI, A/S y T/S (Cuadro 3).

Los valores de MIC para ciprofloxacina presentaron una variación considerable para las cepas aisladas en 2005 (4 - 128 µg/ml) (Cuadro 4), mientras que para las cepas aisladas en 1997 presentaron una variación menor (4 - 16 µg/ml) (Cuadro 5). El 64% de las cepas presentaron un MIC de 8 µg/ml con 2 a 4 mutaciones cromosomales (1 ó 2 en *gyrA*, 1 en *parC* y 1 o ninguna en *parE*), el 19% presentaron un MIC de 4 µg/ml

con tres mutaciones cromosomales (2 en *gyrA* y 1 en *parC*) y el 17% presentaron un MIC de 16 a 128 µg/ml con tres mutaciones cromosomales (2 en *gyrA* y 1 en *parC*). Todas las cepas con MIC ≥ 8 µg/ml presentaron la mutación puntual Ser80Ile en *parC*, substituyendo isoleucina por serina.

Determinación de perfiles plasmídicos

Se realizó el proceso de extracción de DNA plasmídico de todas las cepas, de las cuales 34 (81%) mostraron un perfil plasmídico visible, 18 de 1997 (82%) y 16 (80%) de 2005 (Fig. 3-6). Algunas cepas con perfiles plasmídicos aparentemente idénticos, comparten también el mismo perfil de resistencia, tal es el caso de las cepas 110 y 112 que son, además, las únicas que presentan el perfil de resistencia a las tres fluoroquinolonas, AMP, PI, A/S, TO y T/S, las cepas 281, 282, 284, 288, 289, 290, 291 y 364 que presentan resistencia a las tres fluoroquinolonas, y las cepas 339 y 342 que presentan resistencia a las tres fluoroquinolonas, AMP, PI, A/S y T/S.

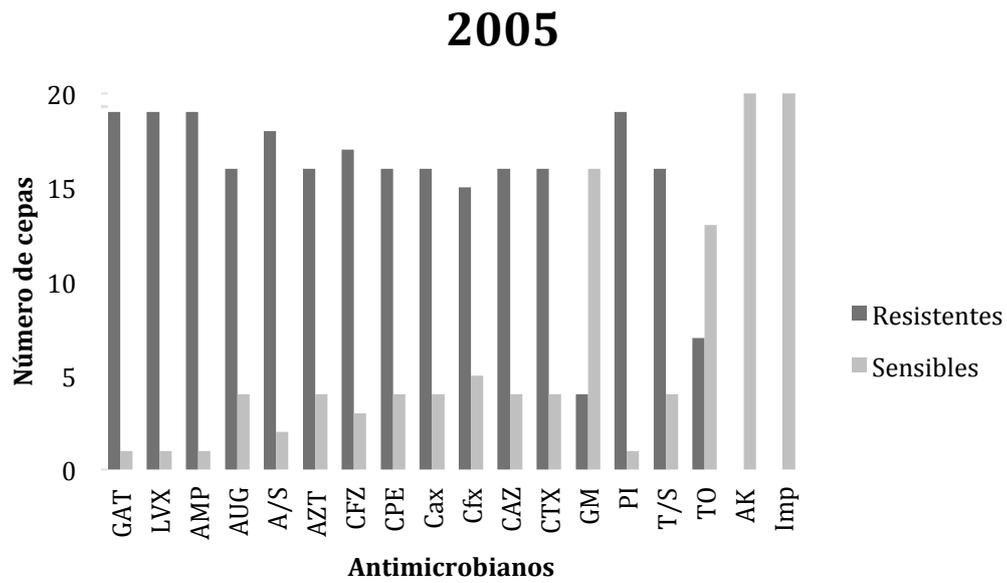


Fig. 1. Número de cepas resistentes y sensibles a 19 antimicrobianos de las 20 cepas de APEC aisladas en 20

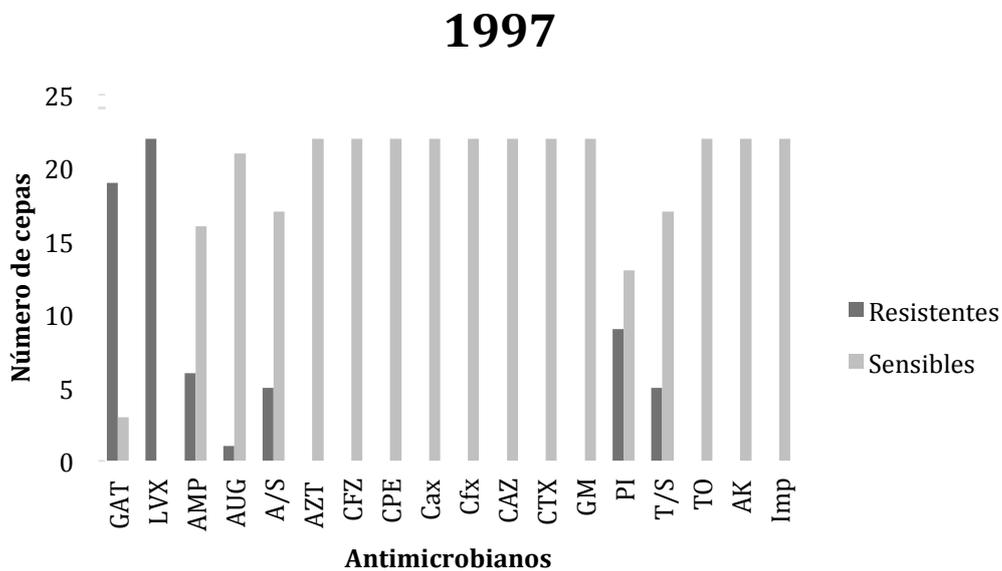


Fig. 2. Número de cepas resistentes y sensibles a 19 antimicrobianos de las 22 cepas de APEC aisladas en 1997

Cuadro 2. Perfiles de resistencia a antimicrobianos de APEC aisladas en 2005.

Perfiles de resistencia	Número de cepas
CIP, LVX	1
CIP, GAT, LVX, AMP, PI, A/S, TO, T/S	2
CIP, GAT, LVX, AMP, PI, A/S, CFZ, TO, T/S	1
CIP, GAT, LVX, AMP, PI, AUG, CFZ, CTX, Cax, CAZ, CPE, AZT, T/S	1
CIP, AMP, PI, AUG, A/S, CFZ, Cfx, CTX, Cax, CAZ, CPE, AZT, GM, TO	1
CIP, GAT, LVX, AMP, PI, AUG, A/S, CFZ, Cfx, CTX, Cax, CAZ, CPE, AZT	1
CIP, GAT, LVX, AMP, PI, AUG, A/S, CFZ, Cfx, CTX, Cax, CAZ, CPE, AZT, T/S	10
CIP, GAT, LVX, AMP, PI, AUG, A/S, CFZ, Cfx, CTX, Cax, CAZ, CPE, AZT, GM, TO	1
CIP, GAT, LVX, AMP, PI, AUG, A/S, CFZ, Cfx, CTX, Cax, CAZ, CPE, AZT, GM, TO, T/S	2
Total	20

Cuadro 3. Perfiles de resistencia a antimicrobianos de APEC aisladas en 1997.

Perfiles de resistencia	Número de cepas
CIP, LVX	1
CIP, GAT, LVX	12
CIP, GAT, LVX, PI	2
CIP, LVX, AMP, PI	1
CIP, GAT, LVX, PI, T/S	1
CIP, GAT, LVX, AMP, PI, A/S	1
CIP, GAT, LVX, AMP, PI, A/S, T/S	3
CIP, GAT, LVX, AMP, PI, AUG, A/S, T/S	1
Total	22

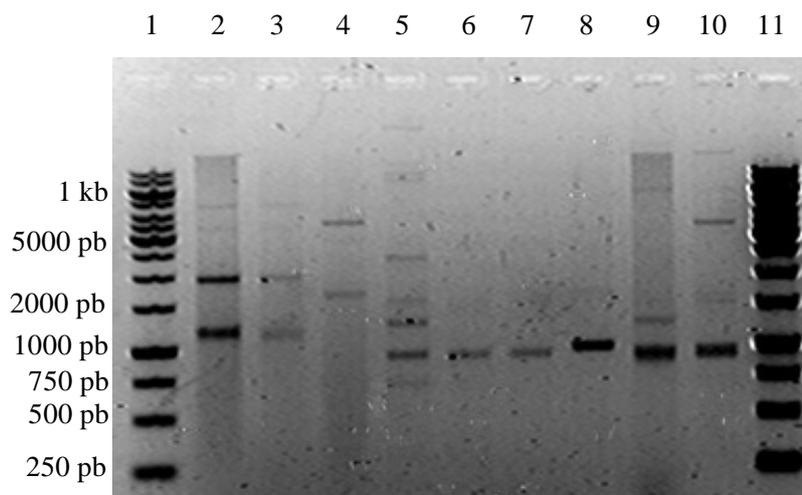


Fig. 3. Perfil plasmídico de cepas de APEC aisladas en 2005

Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1, marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder; carriles 2-10, cepas 110, 112, 115, 171, 174, 176, 181, 182 y 183; carril 11, marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder.

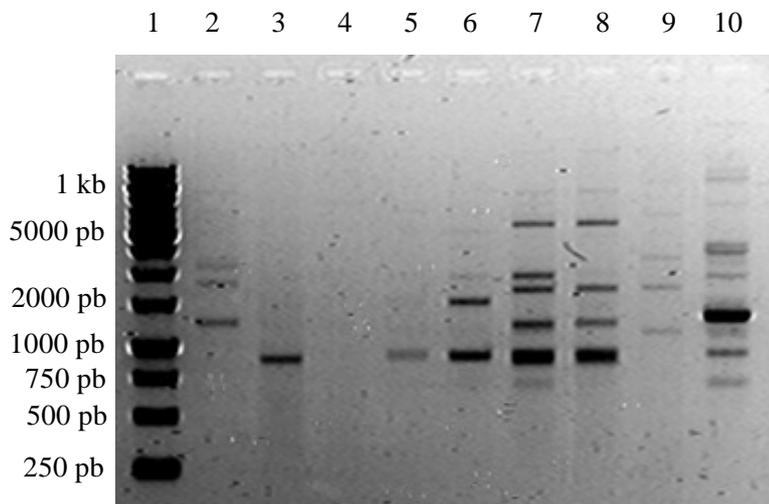


Fig. 4. Perfil plasmídico de cepas de APEC aisladas en 2005 y 1997

Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1, marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder; carriles 2-10, cepas 188, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 208 y 234.

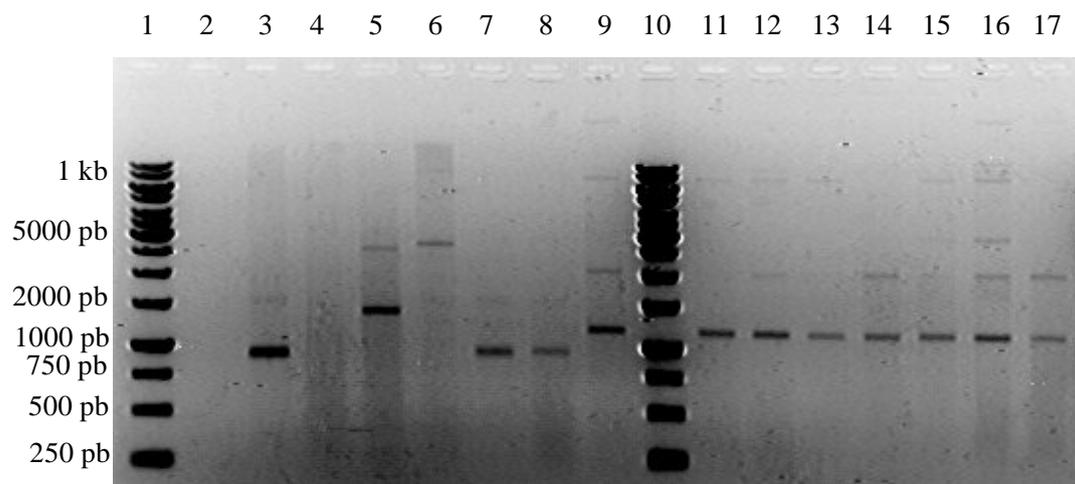


Fig. 5. Perfil plasmídico de cepas de APEC aisladas en 1997

Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1, marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder; carriles 3-9, cepas 235, 285, 287, 361, 339, 342, 364; carril 10, marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder; carriles 11-17, cepas 281, 282, 284, 288, 289, 290, 291.

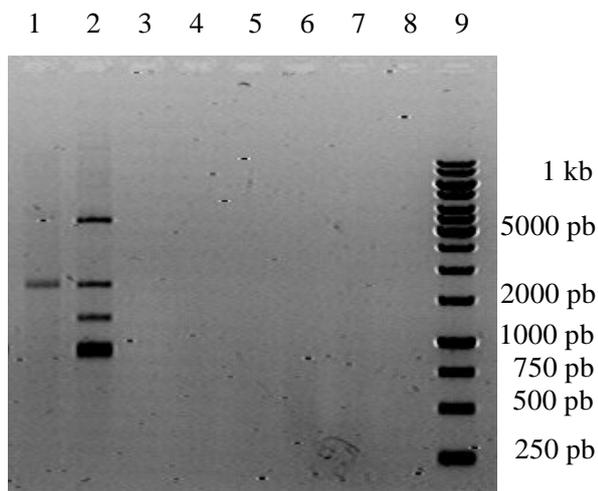


Fig. 6. Perfil plasmídico de cepas de APEC aisladas en 2005 y 1997 (b)

Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. Carriles 1-8, cepas 357, 387, 167, 168, 169, 172, 292, 312; carril 12, marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder.

Identificación de mutaciones puntuales en los genes *gyrAB* y *parCE*

Se estandarizaron las condiciones para la amplificación por PCR de los genes cromosomales *gyrAB* y *parCE* y se obtuvieron fragmentos de DNA amplificado del tamaño esperado (Fig. 7-10). Los productos amplificados fueron purificados y secuenciados en ambos sentidos para obtener la secuencia consenso de nucleótidos. Se obtuvieron las secuencias deducidas de aminoácidos mediante el programa Vector NTI, las cuales fueron alineadas y comparadas con diversas secuencias de *E. coli* depositadas en la base de datos del GenBank del NCBI para identificar cambios en la secuencia de aminoácidos.

Las 42 cepas de *E. coli* presentaron al menos una mutación puntual en el codón 83 de *gyrA* substituyendo leucina por serina (Ser83Leu) y 41 cepas presentaron una segunda mutación en el codón 87, 32 substituyendo asparagina por ácido aspártico (Asp87Asn), 5 substituyendo por tirosina (Asp87Tyr) y 4 por glicina (Asp87Gly). Todas las cepas presentaron también una mutación puntual en el codón 80 de *parC*, 38 substituyendo isoleucina por serina (Ser80Ile) y 4 substituyendo por arginina (Ser80Arg). Las cepas con MIC para ciprofloxacina de 16-128 µg/ml mostraron la mutación Ser80Ile. Solamente 2 cepas presentaron una mutación puntual en el codón 458 de *parE* substituyendo alanina por serina (Ser458Ala). No se identificó ninguna mutación puntual en *gyrB* (Cuadros 4-5).

Identificación de los genes plasmídicos *qnrABS*

Se estandarizaron las condiciones de amplificación para los genes plasmídicos *qnrABS* a partir de las cepas control. Ninguna cepa del estudio fue positiva a genes *qnrABS*. En la figura 11 se muestra la amplificación de los genes de las cepas control.

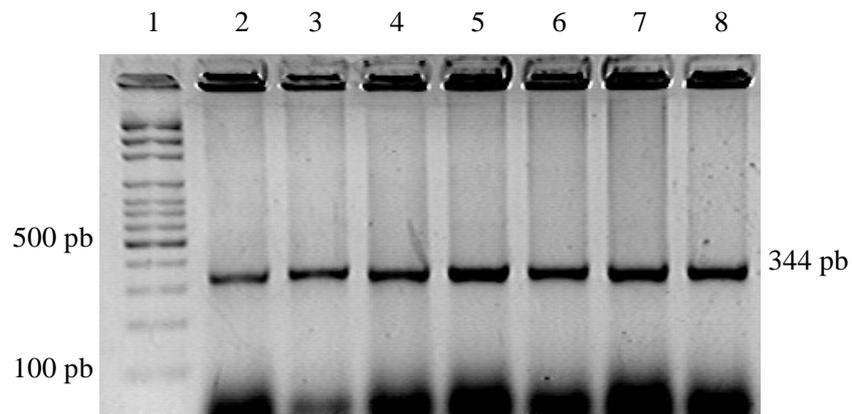


Fig. 7. Amplificación del gen cromosomal *gyrA* de cepas de APEC

Gel de agarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio. Carril 1, marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder; carriles 2-8, cepas 208, 234, 235, 281, 282, 284 y 285.

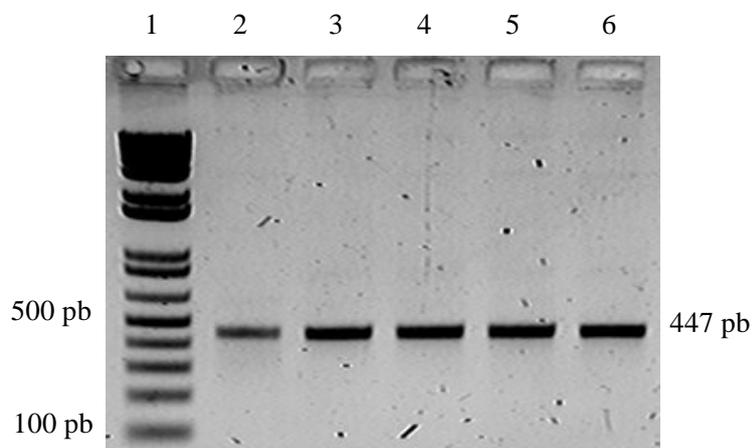


Fig. 8. Amplificación del gen cromosomal *gyrB* de cepas de APEC

Gel de agarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio. Carril 1, marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder; carriles 2-6, cepas 287, 288, 289, 290 y 291.

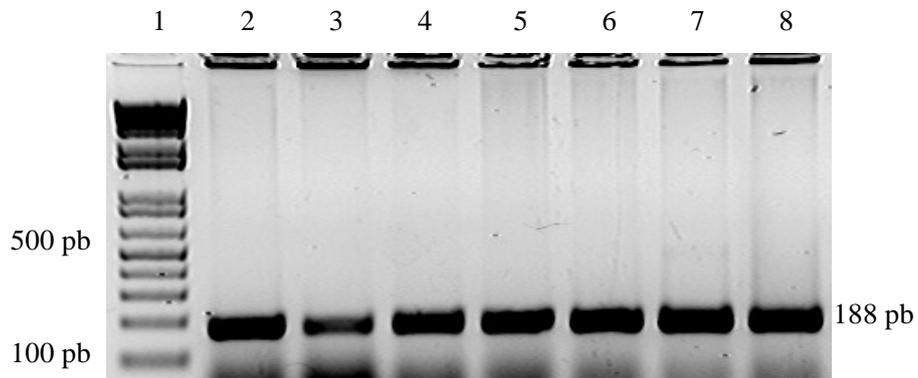


Fig. 9. Amplificación del gen cromosomal *parC* de cepas de APEC
 Gel de agarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio. Carril 1, marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder; carriles 2-8, cepas 110, 112, 115, 167, 168, 169 y 171.

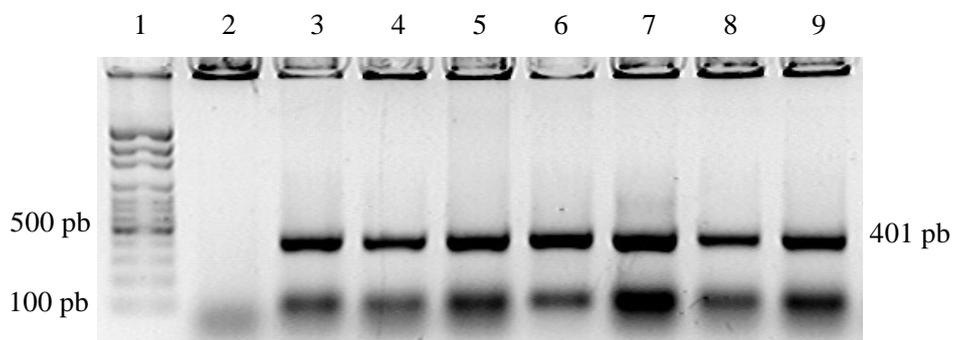


Fig. 10. Amplificación del gen cromosomal *parE* de cepas de APEC
 Gel de agarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio. Carril 1, marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder; carril 2, control negativo; carriles 3-9, cepas 312, 329, 339, 341, 342, 357 y 361.

Identificación del gen plasmídico *aac(6')-Ib-cr* aminoglucósido acetiltransferasa

Se estandarizaron las condiciones de amplificación para el gen plasmídico *aac(6')-Ib* aminoglucósido acetiltransferasa a partir de la cepa control y se obtuvieron fragmentos de DNA amplificado del tamaño esperado. Todos los amplificadores positivos para *aac(6')-Ib* fueron digeridos con la enzima *FokI* para distinguir entre el gen silvestre y la variante *cr*.

Un total de 15 cepas (68%) aisladas en 1997 y 7 cepas (35%) aisladas en 2005 fueron positivas al gen *aac(6')-Ib* y posteriormente digeridas con la enzima *FokI*. Como resultado, 6 cepas (27%) de 1997 presentaron dos bandas de 210-pb y 272-pb correspondientes al gen silvestre, 5 cepas (23%) presentaron una sola banda de 482-pb correspondiente a la variante *aac(6')-Ib-cr* y 4 cepas (18%) presentaron las tres bandas correspondientes a la presentación tanto del gen silvestre como de la variante *cr*. De las cepas de 2005, 4 cepas (20%) presentaron el gen silvestre, 1 cepa (5%) presentó la variante *aac(6')-Ib-cr* y 2 cepas (10%) presentaron ambos genes (Fig. 12-13; Cuadros 4–5). No se observó ninguna relación entre la identificación de estos genes y los perfiles plasmídicos presentados, incluso algunas cepas no mostraron perfiles plasmídicos visibles.

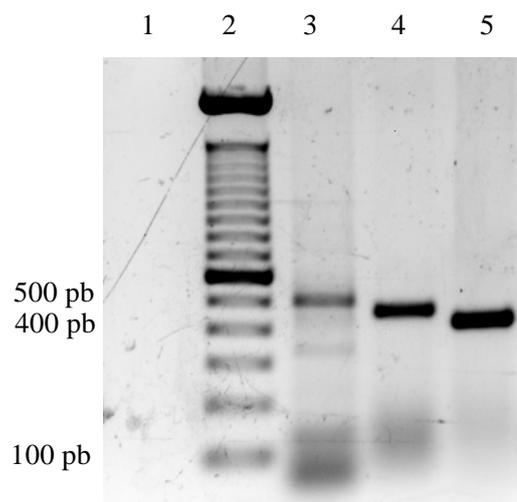


Fig. 11. Amplificación de los genes *qnrABS* de cepas control de *E. coli*
 Gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio. Carril 1, control negativo *E. coli* K12; carril 2, marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder; carril 3, control positivo *qnrA E. coli* 580 (515 pb); carril 3, control positivo *qnrB E. coli* 264 (469 pb); carril 4, control positivo *qnrS E. coli* 428 (428 pb).

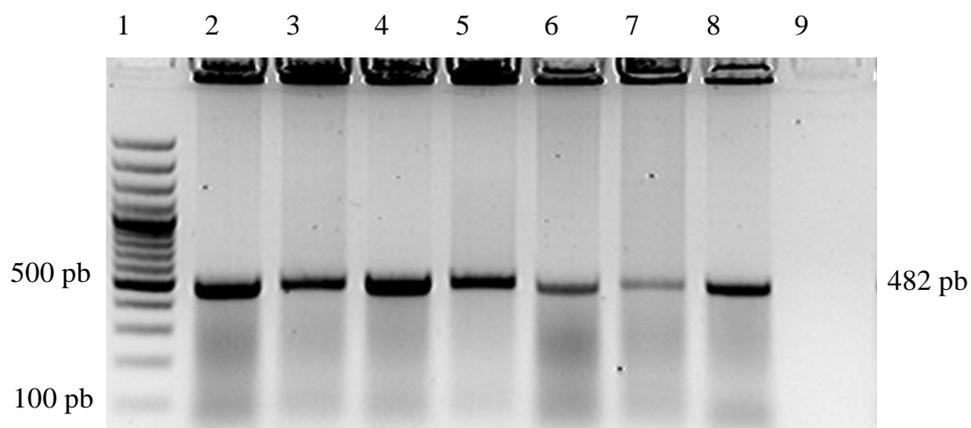


Fig. 12. Amplificación del gen plasmídico *aac(6')-Ib* de cepas de APEC
 Gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio. Carril 1, marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder; carril 2, control positivo; carriles 3-8, cepas 110, 112, 115, 168, 169, 171 y 172; carril 9, control negativo.

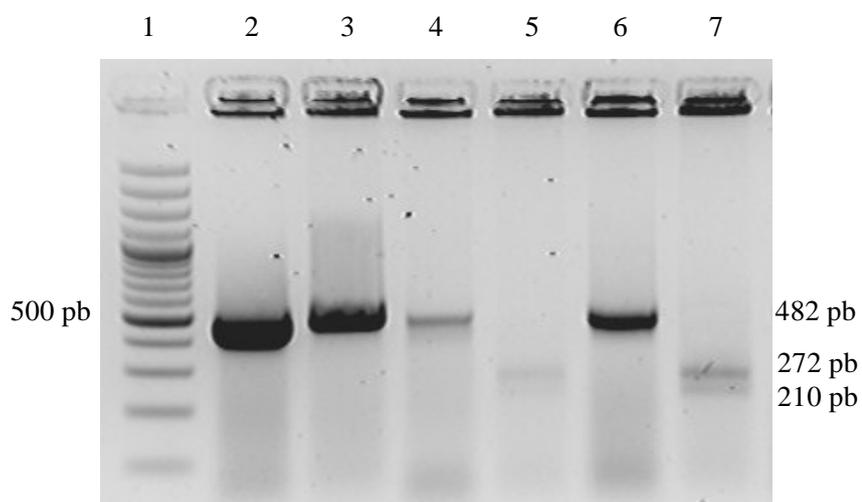


Fig. 13. Amplificación y digestión con la enzima *FokI* del gen plasmídico *aac(6')-Ib* de cepas de APEC

Gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio. Carriles: 1, marcador de peso molecular 100pb; carril 2, control positivo *aac(6')-Ib-cr*; carril 3, control positivo *aac(6')-Ib-cr* digerido; carril 4, cepa 112; carril 5, cepa 112 digerida; carril 6, cepa 168; carril 7, cepa 168 digerida.

Cuadro 4. Mutaciones cromosomales, valores de MIC para ciprofloxacina y determinantes plasmídicos de las cepas de APEC aisladas en 2005.

ID	Mutaciones <i>gyrA</i>	Mutaciones <i>parC / parE</i>	MIC ciprofloxacina	Presencia de <i>aac(6')-Ib</i>	Presencia de <i>qnrABS</i>
110	S83L/D87N	S80I	8	silvestre / variante <i>cr</i>	no
112	S83L/D87N	S80I	8	silvestre	no
115	S83L/D87N	S80I	4	silvestre / variante <i>cr</i>	no
167	S83L/D87N	S80I	8	no	no
168	S83L/D87N	S80I	16	silvestre	no
169	S83L/D87N	S80I	16	silvestre	no
171	S83L/D87N	S80I	8	silvestre	no
172	S83L/D87N	S80I	128	variante <i>cr</i>	no
174	S83L/D87N	S80R	4	no	no
176	S83L/D87N	S80I	16	no	no
181	S83L/D87N	S80I	8	no	no
182	S83L/D87G	S80I	8	no	no
183	S83L/D87Y	S80R	8	no	no
188	S83L/D87N	S80I	64	no	no
191	S83L	S80R	8	no	no
192	S83L/D87N	S80R	4	no	no
193	S83L/D87Y	S80I	8	no	no
194	S83L/D87Y	S80I	32	no	no
195	S83L/D87Y	S80I / S458A	8	no	no
196	S83L/D87N	S80I	4	no	no

Cuadro 5. Mutaciones cromosomales, valores de MIC para ciprofloxacina y determinantes plasmídicos de las cepas de APEC aisladas en 1997.

ID	Mutaciones <i>gyrA</i>	Mutaciones <i>parC / parE</i>	MIC ciprofloxacina	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>qnrABS</i>
208	S83L/D87G	S80I	8	silvestre	no
234	S83L/D87G	S80I	8	silvestre	no
235	S83L/D87G	S80I	4	variante <i>cr</i>	no
281	S83L/D87N	S80I	8	silvestre	no
282	S83L/D87N	S80I	8	silvestre	no
284	S83L/D87N	S80I	8	no	no
285	S83L/D87N	S80I	8	variante <i>cr</i>	no
287	S83L/D87N	S80I	8	silvestre	no
288	S83L/D87N	S80I	8	variante <i>cr</i>	no
289	S83L/D87N	S80I	4	silvestre / variante <i>cr</i>	no
290	S83L/D87N	S80I	8	silvestre / variante <i>cr</i>	no
291	S83L/D87N	S80I	16	silvestre / variante <i>cr</i>	no
292	S83L/D87N	S80I	8	silvestre	no
312	S83L/D87N	S80I	8	variante <i>cr</i>	no
329	S83L/D87N	S80I	4	no	no
339	S83L/D87N	S80I	8	variante <i>cr</i>	no
341	S83L/D87N	S80I	8	no	no
342	S83L/D87N	S80I	8	no	no
357	S83L/D87N	S80I	4	no	no
361	S83L/D87N	S80I	8	no	no
364	S83L/D87N	S80I	8	no	no
387	S83L/D87Y	S80I / S458A	8	silvestre / variante <i>cr</i>	no

DISCUSIÓN

La industria avícola es la actividad pecuaria más importante del país, y las infecciones producidas por APEC representan una de las causas que mayor número de pérdidas económicas generan a dicha industria. La terapia con fluoroquinolonas es una de las opciones más utilizadas para el control de estas infecciones, sin embargo, la aparición de resistencia a estos antimicrobianos en cepas de APEC ha supuesto un problema para su control al disminuir la efectividad del medicamento.

A partir del descubrimiento de la aparición de resistencia a fluoroquinolonas en *E. coli*, se han realizado numerosos esfuerzos por conocer la caracterización detallada de los mecanismos de resistencia, su prevalencia y la contribución relativa de los mecanismos individuales en la generación de resistencia en cepas de humanos y animales en varios países del mundo. Aunque se han logrado avances, los detalles antes mencionados aún no son completamente claros y se conoce poco acerca de la distribución geográfica de las diferentes mutaciones cromosomales y determinantes plasmídicos asociados a fluoroquinolonas.

Durante la primera década del 2000, los trabajos de caracterización genética de resistencia a fluoroquinolonas en aves se basaron en la identificación de mutaciones puntuales en la QRDR de los genes cromosomales *gyrAB* y *parCE*, mientras que a partir del 2008, los trabajos de caracterización se dedicaron a la identificación de genes PMQR dejando prácticamente a un lado la caracterización cromosomal. Aunado a esto, el interés por este tipo de estudios en aves se ha centrado en Estados Unidos, algunos países de la Unión Europea, China, Corea, y algunos países de África y son escasos o inexistentes los estudios de caracterización genética de resistencia a antibióticos en aves en el resto del mundo incluyendo América Latina.

En el trabajo de Uchida *et al.*, (2010), realizado en 8 países asiáticos, se sugiere que el incremento en la resistencia a fluoroquinolonas se genera principalmente por mutaciones en la QRDR en cada área geográfica y no por diseminación intercontinental, subrayando la importancia de realizar caracterizaciones de resistencia genotípica en diferentes países.

Es por todo esto, que el objetivo del presente trabajo fue identificar las bases genéticas de la resistencia a fluoroquinolonas en cepas de APEC aisladas de dos empresas avícolas del centro de México en los años 1997 y 2005, y aportar datos retrospectivos valiosos como punto de partida para futuros trabajos de caracterización de resistencia genotípica en cepas de APEC en nuestro país, mostrando un panorama general de la importancia de llevar a cabo dicha caracterización. Para lograr este objetivo, se identificó la presencia de mutaciones puntuales en la región QRDR de los genes cromosomales *gyrAB* y *parCE*, así como la presencia de genes PMQR en cepas de APEC fenotípicamente resistentes a enrofloxacin.

El trabajo fue complementado con la determinación del perfil de resistencia a 19 antimicrobianos. Todas las cepas estudiadas estaban previamente clasificadas como resistentes a enrofloxacin, sin embargo, el porcentaje de resistencia obtenido por antibiograma de los aislamientos totales del muestreo original, fue de 55% a enrofloxacin y 47% a ciprofloxacina para los aislamientos de 1997 y de 62% a enrofloxacin para los aislamientos de 2005 (Rosario *et al.*, 2005; Ramírez-Barrera, 2007). Este porcentaje de resistencia a ciprofloxacina es mayor que el reportado en otros estudios de América Latina como Brasil (>30%), Chile (20%) y Argentina (10%) entre 2003 y 2015 (San Martín *et al.*, 2005; Pantozzi *et al.*, 2010; Koga *et al.*, 2015), Estados Unidos (0-3%), Canadá (0%), España (38%), Francia, Holanda, Suiza y el Reino Unido (>4%) China (30-35%) y Egipto (15%), entre 1997 y 2011 (Sáenz *et*

al., 2001; Bywater *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2012; Tadesse *et al.*, 2012; Mainali *et al.*, 2013; Ahmed *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2014), y menor que porcentajes reportados por países asiáticos como Corea (60%), Irán (67%) y China (62% - 93%) entre 2000 y 2005 (Yang *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Salehi y Bonab, 2006; Li *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2014). Respecto a los porcentajes obtenidos para enrofloxacin, éstos son mayores que los reportados en estudios de Chile (28%), Bélgica (9%) y China (38%) entre 2003 y 2008, y menores que reportes de China (90%), Irán (76%), Corea (71% - 73%) y Brasil (92%) entre 2000 y 2005 (Yang *et al.*, 2004; San Martin *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005; Salehi y Bonab, 2006; Tae-Eun *et al.*, 2007; Smet *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2011; Lima-Filho *et al.*, 2013).

En este trabajo se obtuvieron perfiles de resistencia a partir de cepas seleccionadas previamente como resistentes a fluoroquinolonas, por lo tanto, los porcentajes de resistencia presentados probablemente son más elevados que los presentados en el muestreo original. Sin embargo, se puede destacar el alto porcentaje de resistencia presentado para antimicrobianos de importancia crítica para el humano en las cepas aisladas en 2005. Algunos de los niveles de resistencia más altos se presentan a antimicrobianos que llevan más tiempo en el mercado, como la ampicilina, piperacilina y la combinación de sulfametoxazol/trimetoprim, y se han reportado comúnmente con porcentajes altos de resistencia en cepas de *E. coli* de origen aviar (Sáenz *et al.*, 2001; Bywater *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004; Salehi y Bonab, 2006; Tae-Eun *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2011; Mohamed *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014; Usui *et al.*, 2014; Koga *et al.*, 2015). En cambio, antimicrobianos de importancia para la clínica humana, muchos de ellos relativamente nuevos, como las fluoroquinolonas y las cefalosporinas, incluyendo las de tercera y cuarta generación, mostraron porcentajes de resistencia mayores al 47% y 75%, respectivamente. La

gran mayoría de reportes de resistencia a cefalosporinas en APEC describen resistencias mucho más bajas, de 0-10% para Chile, Brasil, Estados Unidos, Canadá, Francia, Holanda, Suiza, Reino Unido, China, Irán, Vietnam e Indonesia (Bywater *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2005; San Martin *et al.*, 2005; Salehi y Bonab, 2006; Jiang *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2012; Tadesse *et al.*, 2012; Mainali *et al.*, 2013; Koga *et al.*, 2015), 16% para Argentina (Pantozzi *et al.*, 2010), y mayores a 50% solo para Bélgica, Egipto y Brasil (Smet *et al.*, 2008; Mohamed *et al.*, 2014; Koga *et al.*, 2015).

Los resultados obtenidos señalan una emergencia notable de resistencia a antimicrobianos no solo de importancia veterinaria, sino también de importancia para la clínica humana, en especial de las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, que está relacionada comúnmente con la producción de ESBLs y β -lactamasas clase C. Una excepción, en cuanto a antimicrobianos de importancia clínica humana, la conforman los aminoglucósidos, gentamicina y tobramicina, que presentaron niveles bajos de resistencia (20% y 35%, respectivamente), aunque solo superados por reportes de Argentina (24%), Estados Unidos (32% y 69%) y China (26-30%) (Yang *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2005; Pantozzi *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2014).

La presentación de resistencia a fluoroquinolonas y cefalosporinas de amplio espectro de uso humano representa un hallazgo preocupante que señala la importancia de realizar estudios enfocados al origen de esta. Una posibilidad es que se haya presentado como resultado de la co-selección de determinantes de resistencia. En algunos trabajos se ha reportado la presentación de resistencia cruzada entre fluoroquinolonas y entre β -lactámicos (Bazile-Pham-Khac *et al.*, 1996; Kojima *et al.*, 2005; Smet *et al.*, 2008). En el presente trabajo, 90% de los aislamientos presentaron

resistencia a las tres fluoroquinolonas probadas, todas de uso humano, lo que sugiere la presentación de resistencia cruzada con enrofloxacin o alguna otra molécula de este grupo. El uso de β -lactámicos como la ampicilina podría facilitar la presentación de resistencia a otros antimicrobianos del grupo. Se ha reportado, además, que la resistencia a quinolonas suele ser alta en algunas cepas productoras de ESBL y casi siempre viene acompañada por multiresistencia, y que los genes *qnr* y *aac(6')-Ib-cr* frecuentemente son co-transmitidos y co-seleccionados con ciertos genes ESBL, por ejemplo, CTX-M frecuentemente es asociado con *aac(6')-Ib-cr* y *qnr* dentro del grupo de plásmidos IncF e IncI (Tolun *et al.*, 2004; Poirel *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2008; Caratolli, 2009; Silva-Sánchez *et al.*, 2011). En este trabajo, 15 de 16 (94%) cepas resistentes a aztreonam y cefalosporinas de tercera y cuarta generación, presentaron resistencia a las tres fluoroquinolonas probadas, apoyando la hipótesis de co-selección. De ser este el origen de la resistencia, una posible falta de control en el uso de antimicrobianos en el pollo de engorda podría estar suponiendo un grave riesgo de salud pública por la posibilidad de transferencia de genes de resistencia a cepas de humanos. Sin embargo, una segunda posibilidad es que haya ocurrido lo contrario, es decir, que sea el humano el origen de los genes de resistencia, por ejemplo, del determinante PMQR *aac(6')-Ib-cr*.

La determinación del perfil de resistencia mostró una clara diferencia entre los aislamientos de 1997 y los de 2005. El 70% de las cepas de 1997 presentaron resistencia únicamente a fluoroquinolonas o a fluoroquinolonas, ampicilina y piperacilina. En cambio, de las cepas de 2005, 19 (95%) fueron resistentes a 7 o más antimicrobianos. La diferencia presentada entre ambos perfiles puede deberse a la diferencia en el año de muestreo, ya que los aislamientos de 2005, los cuales presentan mayor resistencia, fueron obtenidos 8 años después, permitiendo un periodo

mayor de exposición a los antimicrobianos, como se observa en estudios retrospectivos (Tae-Eun *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010; Tadesse *et al.*, 2012), así como a las diferencias en el uso de antimicrobianos en ambas empresas, diferencias en medidas de higiene, bioseguridad y manejo, entre otras.

Los perfiles de resistencia encontrados para los aislamientos de 2005, sugieren la necesidad de realizar mayor número de estudios de resistencia a antibióticos en cepas de APEC en México, tomando en cuenta antimicrobianos de uso humano y de reciente introducción al mercado, incluyendo a las fluoroquinolonas y β -lactámicos de espectro extendido, ya sea por la posibilidad de que se esté presentando co-selección y transferencia de cepas resistentes de las aves al humano, o del humano a las aves, y utilizar la información obtenida para proponer estrategias de control.

Uno de los objetivos principales del estudio fue el de identificar las mutaciones cromosomales puntuales y la sustitución de aminoácidos presentados en la QRDR de los genes *gyrAB* y *parCE*. Treinta y nueve cepas (93%) presentaron 3 sustituciones de aminoácidos (dos en *gyrA* y una en *parC*), una cepa (2%) presentó dos sustituciones (una en *gyrA* y una en *parC*), y dos cepas (5%), una de cada año, presentaron 4 sustituciones (dos en *gyrA*, una en *parC* y una en *parE*).

Las mutaciones encontradas en *gyrA* se localizan en los aminoácidos comúnmente reportados, Ser83 y Asp87, y todas han sido descritas anteriormente en muestras de APEC. Las mutaciones en Ser83 (100% de los aislamientos) corresponden con un cambio a leucina, que es la mutación más común presentada en cepas de *E. coli* resistentes a quinolonas y se ha reportado como la mutación con mayor influencia en la resistencia a quinolonas (Bagel *et al.*, 1999). Esta tendencia se ha observado en otros estudios en aves con colibacilosis (White *et al.*, 2000; Giraud *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2005) y también en muestras fecales de aves sanas (Lee *et*

al., 2005) en los cuales las cepas que presentaron una o dos mutaciones puntuales en *gyrA* presentaron la mutación de serina a leucina. En el codón Asp87 se presentaron cambios a tres aminoácidos diferentes, el más común fue a asparagina (78%) que está reportada como la mutación más frecuente para este codón, seguido de tirosina (12%) y glicina (10%). Estos resultados concuerdan con la mayoría de estudios en aves donde la mutación a Asn se encuentra en más del 50% de mutaciones presentadas en Asp87, la mutación a Tyr se reporta de 5% a 30% con excepción del estudio de Giraud *et al.*, (2001) en pavos, donde representa el 100%, y las mutaciones en Gly, Ala e His se reportan en menos del 3% (Yang *et al.*, 2004, Lee *et al.*, 2005, Tae-Eun *et al.*, 2007). La presentación de mutaciones en estos codones es consistente con lo publicado por Yoshida *et al.*, (1990) quien señala que éstas confieren niveles más altos de resistencia a quinolonas que las mutaciones en otros codones dentro de la QRDR.

La mutación en el aminoácido Ser80 a isoleucina representó el 90% de las mutaciones en *parC*, la cual es la mutación más comúnmente reportada en este sitio (Giraud *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Vanni *et al.*, 2014).

Con respecto a *gyrB*, no se observó ninguna mutación dentro de la QRDR, lo que es consistente con la teoría de Nakamura *et al.*, (1989) que sugiere que la frecuencia de mutaciones espontáneas en *gyrA* en aislados clínicos es mucho mayor que en *gyrB*, debido probablemente a que las primeras son más resistentes a quinolonas que las mutantes *gyrB* y por lo tanto presentan ventaja selectiva. Esto se ha visto reforzado en estudios en cepas de aves que han caracterizado *gyrB*, ya sea que no se presenta ninguna mutación en este gen (Giraud *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2004) o solo se presentaron en el 9% de las cepas (Zhao *et al.*, 2005).

Solo dos cepas presentaron una mutación en *parE* que corresponde a Ser458Ala. Las mutaciones en *parE* tampoco son comúnmente reportadas en estudios de caracterización en cepas de aves, la única mutación presentada en las cepas de este trabajo, Ser458Ala, fue reportada en un estudio en China que no distingue entre aislados de aves y cerdos (Yang *et al.*, 2004).

También se determinó la presencia de los genes PMQR *qnrABS* y *aac(6')-Ib-cr*. Nueve aislamientos de 1997 (41%) y 3 del 2005 (15%) fueron positivos a *aac(6')-Ib-cr*. Este gen representa al determinante PMQR más reportado a nivel mundial con 124 cepas positivas, sin embargo, las prevalencias encontradas en este trabajo son mayores a las reportadas en estudios de Reino Unido (1%), China (12% y 36%), Japón (0.8%), Corea del Sur (0.2% y 1.1%) y Egipto (7%) (Huang *et al.*, 2009; Gosling *et al.*, 2012; Tamang *et al.*, 2012; Randall *et al.*, 2013; Kawanishi *et al.*, 2013; Ahmed *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2014; Oh *et al.*, 2016). China es el país con mayor número de cepas reportadas positivas a *aac(6')-Ib-cr* con 106 en tres estudios diferentes, y al igual que en este trabajo, representó al determinante PMQR más prevalente.

Ninguna de las 42 cepas evaluadas fue positiva a los determinantes *qnrABS*. Los determinantes Qnr en general no son reportados con prevalencias altas en estudios de cepas de *E. coli* obtenidas de aves. El gen *qnrS* es el segundo determinante PMQR con mayor número de reportes de cepas positivas obtenidas de aves con 123, en estudios de Italia, Polonia, Holanda, Reino Unido, Eslovaquia, China, Corea del Sur, Nigeria, Egipto y Túnez, y es el único determinante PMQR reportado en América con 3 cepas positivas (6%) en Ecuador. Aún así, la prevalencia más alta reportada es de solo 15% en Egipto y en general oscila entre 1% a 8%. China y Corea del Sur han reportado el mayor número de cepas positivas con 45 y 34, respectivamente

(Cerquetti *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2009; Kmet y Kmetová, 2010; Zhao *et al.*, 2010; Fortini *et al.*, 2011; Veldman *et al.*, 2011; Gosling *et al.*, 2012; Tamang *et al.*, 2012; Ahmed *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Armas-Freire *et al.*, 2015; Kilani *et al.*, 2015; Oh *et al.*, 2016).

El gen *qnrB* se ha reportado en 78 cepas en Polonia, Reino Unido, China, Corea del Sur, Túnez, Egipto y Nigeria. Las prevalencias más altas se han reportado en Túnez (59%) y Egipto (33%), y el mayor número de cepas positivas, en China y Egipto (24 en cada uno). Las variantes más reportadas son *qnrB1* y *qnrB2*. Se ha reportado como el determinante PMQR más prevalente en estudios de Reino Unido, Túnez y Egipto, pero en general, la prevalencia reportada a nivel mundial es baja (1% a 4%) (Ma *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2009; Fortini *et al.*, 2011; Veldman *et al.*, 2011; Tamang *et al.*, 2012; Gosling *et al.*, 2012; Ahmed *et al.*, 2013; Randall *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2014; Kilani *et al.*, 2015; Oh *et al.*, 2016).

El gen *qnrA* se ha reportado en 11 cepas, con prevalencia de 0.7% en China y 10% en Egipto (Huang *et al.*, 2009; Ahmed *et al.*, 2013).

También se han reportado los genes plasmídicos *qepA* en 10 cepas en China, Corea del Sur y Nigeria y *oqxA* en 3 cepas en China (Ma *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010; Fortini *et al.*, 2011; Oh *et al.*, 2016).

Es importante resaltar la necesidad de realizar caracterizaciones de cepas aisladas recientemente, ya que los reportes mundiales señalan la tendencia al aumento en la prevalencia de genes PMQR y por ende, de la resistencia a quinolonas. En concordancia con la propuesta de que la presencia del gen *aac(6)-Ib-cr* contribuye solo a la disminución de la susceptibilidad a fluoroquinolonas, la presencia de este gen en las cepas positivas de este trabajo no parecen influir con el aumento del MIC a ciprofloxacina, pero es posible que haya contribuido con la prevalencia de resistencia

a fluoroquinolonas al facilitar la presentación de mutaciones cromosomales y que esta resistencia vaya en aumento. A pesar de no haberse encontrado genes *qnr* en este trabajo, la alta prevalencia del gen *aac(6')-Ib-cr* en comparación con otros reportes de aislados mucho más recientes y la gran cantidad de cepas que presentan perfiles plasmídicos, remarcan la posibilidad de que exista alta movilidad de plásmidos entre cepas y hoy en día se presenten prevalencias altas para otros determinantes PMQR.

Uno de los problemas a considerar que se presentan con el desarrollo de la resistencia a fluoroquinolonas, es el requerimiento de presentar al menos dos mutaciones dentro de la QRDR de *gyrA* para que se exprese el fenotipo de resistencia por antibiograma. Se ha visto que la combinación de dos mutaciones dentro de la QRDR de los genes *gyrA* y *parC*, suele tener menor impacto en la viabilidad de la bacteria que las mutaciones individuales (Marcusson *et al.*, 2009), por lo tanto, una vez que se ha seleccionado una mutación cromosomal de resistencia, hay mayor probabilidad de selección de una segunda, tanto por aumento en el *fitness*, como por presión por el uso de antibióticos. El limitado costo en el *fitness*, o la falta de este, de las mutaciones asociadas a resistencia a fluoroquinolonas, y la habilidad para obtener otras mutaciones para mitigar cualquier costo posible, sugiere que estas cepas no estarán en desventaja en la ausencia de presión por antibiótico y por lo tanto pueden persistir indefinidamente (Baker, 2013), permitiendo su diseminación. Aunado a esto, la prevalencia notablemente alta del gen plasmídico *aac(6')-Ib-cr* principalmente en las cepas de 1997, pueden haber influido para que cepas fenotípicamente sensibles a fluoroquinolonas, pero que presentaran una mutación en la QRDR del gen *gyrA*, al ser expuestas al uso clínico de fluoroquinolonas después de haber obtenido un antibiograma sensible, generaran una segunda mutación resistente.

Por último, se determinó el MIC a ciprofloxacina por el método de dilución en caldo. Genotípicamente se observó una correlación entre el fenotipo resistente a ciprofloxacina y el número de mutaciones presentadas en *gyrA* y *parC*, que concuerda con la teoría de mutaciones escalonadas (Vila *et al.*, 1996; Heisig, 1996), es decir, una o dos mutaciones en *gyrA* y una o dos mutaciones en *parC* confieren resistencia moderada a alta (4 a 64 µg/ml), lo cual se ha observado en estudios previos en aves (Giraud *et al.*, 2001; Sáenz *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2004). Por otro lado, a pesar de que la mayoría de las cepas presentaron el mismo número de mutaciones y las mismas sustituciones de aminoácidos, el rango de diferencia entre los MIC presentados es alto (4 a 128 µg/ml), lo que sugiere la presentación de otros mecanismos de resistencia entre las cepas con MIC más altos, diferentes a la presentación de mutaciones cromosomales en *gyrAB* y *parCE* y de determinantes PMQR, como las bombas de eflujo cromosomales o la disminución de la permeabilidad de la membrana, en especial en las cepas de 2005. Se han descrito aumentos al MIC de antimicrobianos después de la sobreexpresión de más de una bomba de eflujo de diferentes clases, resultando en cepas de *E. coli* altamente resistentes, y por lo tanto, estas bacterias mutantes, pueden ser seleccionadas sin la adquisición de nuevo material genético (Lee *et al.*, 2000).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que las cepas de APEC resistentes a fluoroquinolonas recuperadas de dos empresas avícolas integradas del centro de México en los años de 1997 y 2005, comparten mutaciones puntuales cromosomales en los genes *gyrAB* y *parCE* en común con cepas descritas previamente por otros

investigadores a nivel mundial, y que estos mecanismos confieren un MIC de resistencia a ciprofloxacina similar.

Se describe una incidencia del gen PMQR *aac(6')-Ib-cr* aminoglucósido acetiltransferasa mayor a la descrita en otros estudios similares a nivel mundial, la cual podría haber favorecido el aumento en la selección de cepas resistentes. No se identificó la presencia de genes *qnrABS*.

Se describe el hallazgo de un alto porcentaje de MR (95%) y de resistencia a antimicrobianos de importancia clínica humana (>75%) y que no se utilizan en pollos de engorda, como las fluoroquinolonas y β -lactámicos de espectro extendido (cefalosporinas de tercera y cuarta generación), en las cepas aisladas en 2005.

PERSPECTIVAS

A partir de algunos de los resultados encontrados, se sugieren las siguientes propuestas: realizar estudios de caracterización de resistencia genotípica a fluoroquinolonas en cepas obtenidas de aislamientos más recientes, incluyendo mecanismos alternos como la presencia de otros determinantes PMQR y bombas de eflujo, así como de resistencia a otros antimicrobianos de importancia crítica como las cefalosporinas de tercera y cuarta generación (presencia de β -lactamasas), y el origen de esta, para elaborar propuestas de control de la resistencia en base a los resultados. También se sugiere plantearse la razón por la cual la presencia del gen plasmídico *aac(6')-Ib* y *aac(6')-Ib-cr* aparentemente no confiere resistencia a amicacina y tobramicina en las cepas positivas.

REFERENCIAS

1. Gyles CL, Fairbrother JM. *Escherichia coli*. En: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO, editores. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 3rd ed. Iowa: Blackwell Publishing; 2004. P. 194-214.
2. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 2013; 26: 822-80.
3. Johnson TJ, Wannemuehler YM, Johnson SJ, Logue CM, White DJ, Doetkott C, Nolan LK. Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. Appl Environ Microbiol 2007; 73: 1976- 1983.
4. Mellata M, Ameiss K, Mo H, Curtiss III R. Characterization of the contribution to virulence of three large plasmids of avian pathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun 2010; 78: 1528–1541.
5. Rodriguez-Siek K, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Nolan LK. Characterizing the APEC pathotype. Vet Res 2005; 36: 241–256.
6. Nolan LK, Barnes HJ, Vaillancourt J, Abdul-Aziz T, Logue C. Colibacillosis. En: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Nair VL, editors. Diseases of Poultry. 13th ed. New Jersey: Wiley-Blackwell; 2013. P. 751-785.
7. Delicato ER, de Brito BG, Gaziri, LCJ, Vidotto MC. Virulence associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. Vet Microbiol 2003; 94: 97-103.
8. Kemmett K, Humphrey T, Rushton S, Close A, Wigley P, Williams NJ. A longitudinal study simultaneously exploring the carriage of APEC virulence associated genes and the molecular epidemiology of faecal and systemic *E.*

- coli* in commercial broiler chickens. *PLoS ONE* 2013; **8**:e67749.
9. Lutful KSM. Avian colibacillosis and salmonellosis: a closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. *Int J Environ Res Public Health* 2010; **7**: 89-114.
 10. Rosario CC, Puente JL, Verdugo-Rodríguez A, Anderson RC, Eslava CC. Phenotypic characterization of *ipaH*+ *Escherichia coli* strains associated with yolk sac infection. *Avian Dis* 2005; **49**: 409-417.
 11. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use. Reflection paper on the use of fluoroquinolones in food-producing animals in the European Union: development of resistance and impact on human and animal health. London (UK): CMPV, 2006.
 12. Medders W, Wooley R, Gibbs P, Shotts E, Brown J. Mutation rate of avian intestinal coliform bacteria when pressured with fluoroquinolones. *Avian Dis* 1998; **42**: 146–153.
 13. Engberg J, Aarestrup F, Smidt P, Nachamkin I, Taylor D. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerg Infect Dis* 2001; **7**: 24-34.
 14. Leshner G, Froelich E, Gruett M, Bailey J, Brundage R. 1,8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *J Med Chem* 1962; **5**: 1063-1065.
 15. Suh B, Lorber B. Quinolones. *Med Clin North Am* 1995; **79**: 869-894.
 16. Paton J, Reeves D. Fluoroquinolone antibiotics. Microbiology, pharmacokinetics and clinical use. *Drugs* 1988; **36**: 193-228.
 17. Chu D. The future role of quinolones. *Exp Opin Ther Patents* 1996; **6**: 711-737.

18. Andriole VT. The Quinolones: Past, Present, and Future. *Clin Infect Dis* 2005; 41: S113-S119.
19. Bates AD, Maxwell A. *DNA Topology*. Oxford: Oxford University Press; 2005.
20. Gellert M, Mizuuchi K, O'Dea M, Nash H. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc Natl Acad Sci* 1976; 73: 3872-3876.
21. Cozzarelli N. DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Science* 1980; 207: 953-961.
22. Levine C, Hiasa H, Marians K. DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1400: 29-43.
23. Wang J. DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* 1996; 65: 635-692.
24. Kampranis SC, Maxwell A. Conversion of DNA gyrase into a conventional type II topoisomerase. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93:14416– 14421.
25. Reece RJ, Maxwell A. DNA Gyrase: structure and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1991; 26: 335-375.
26. Kato J, Nishimura Y, Imamura R, Niki H, Hiraga S, Suzuki H. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell* 1990; 63: 393-404.
27. Kreuzer K, Cozzarelli N. *Escherichia coli* mutants thermosensitive for deoxyribonucleic acid gyrase subunit A: effects on deoxyribonucleic acid replication, transcription, and bacteriophage growth. *J Bacteriol* 1979; 140:424-435.
28. Hiasa H, Yousef D, Marians K. DNA strand cleavage is required for

- replication fork arrest by a frozen topoisomerase-quinolone-DNA ternary complex. *J Biol Chem* 1996; 271: 26424-26429.
29. Klevan L, Wang J. A DNA-DNA gyrase complex containing 140 base pairs of DNA and an $\alpha_2\beta_2$ protein core. *Biochemistry* 1980; 19: 5229-5234.
30. Kirchhausen T, Wang J, Harrison S. DNA gyrase and its complexes with DNA: direct observation by direct microscopy. *Cell* 1985; 41: 933-943.
31. Harder KJ, Nikaido H, Matsubashi M. Mutants of *Escherichia coli* that are resistant to certain beta-lactam compounds lack the *ompF* porin. *Antimicrob Agents Chemother* 1981; 20: 549-552.
32. Webber M, Piddock L. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 9-11.
33. Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Nakamura S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 1271-1272.
34. Vila J, Ruiz J, Goñi P, Jiménez de Anta T. Detection of mutations in *parC* in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 491-493.
35. Bagel S, Hüllen V, Wiedemann B, Heisig P. Impact of *gyrA* and *parC* mutations on quinolone resistance, doubling time, and supercoiling degree of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999, 43: 868-875.
36. Heisig P. Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996, 40: 879-885.
37. Weigel L, Steward C, Tenover F. *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in eight species of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob*

- Agents Chemother 1998; 42: 2661–2667.
38. Breines DM, Ouabdesselam S, Ng EY, Tankovic J, Shah S, Soussy CJ, Hooper DC. Quinolone resistance locus *nfxD* of *Escherichia coli* is a mutant allele of the *parE* gene encoding a subunit of Topoisomerase IV. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 175-179.
 39. Willmott C, Maxwell A. A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37: 126-127.
 40. Hiasa H, Shea M. DNA gyrase-mediated wrapping of the DNA strand is required for the replication fork arrest by the DNA gyrase-quinolone-DNA ternary complex. J Biol Chem 2000; 275: 34780-34786.
 41. Nakamura S, Nakamura M, Kojima T, Yoshida H. *gyrA* and *gyrB* mutations in quinolone-resistant strains of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33: 254-255.
 42. Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Yamanaca L, Nakamura S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 1647-1650.
 43. Hopkins K, Davies R, Threlfall E. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. Int J Antimicrob Agents 2005; 25: 358- 373.
 44. Uchida Y, Mochimaru T, Morokuma Y, Kiyosuke M, Fujise M, Eto F, *et al.* Geographic distribution of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* strains in Asia. Int J Antimicrob Agents 2010; 35: 387-391.
 45. White D, Piddock L, Maurer J, Zhao S, Ricci V, Thayer S. Characterization of fluoroquinolone resistance among veterinary isolates of avian *Escherichia*

- coli*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 2897-2899.
46. Giraud E, Leroy-Sétrin S, Flaujac G, Cloeckaert A, Dho-Moulin M, Chaslus-Dancla E. Characterization of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* O78:K80 isolated from turkeys. 2001; 47: 341-343.
47. Sáenz Y, Zarazaga M, Briñas L, Ruiz-Larrea F, Torres C. Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals. J Ant Chemother 2003; 51: 1001-1005.
48. Yang H, Chen S, White D, Zhao S, McDermott P, Walker R, Meng J. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. J Clin Microbiol 2004; 42: 3483-3489.
49. Khan A, Nawaz M, Summage C, Khan S, Lin J. Isolation and molecular characterization of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* from poultry litter. Poult. Sci. 84:61-66. 2005.
50. Lee Y, Cho J, Kim K, Tak R, Kim A, Kim J, *et al*. Fluoroquinolone resistance and *gyrA* and *parC* mutations of *Escherichia coli* isolated from chicken. J Microbiol 2005; 43: 391-397.
51. Zhao S, Maurer J, Hubert S, De Villena J, McDermott P, Meng J, *et al*. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. Vet Microbiol 2005; 107: 215-224.
52. Tae-Eun K, Yong-Wun J, Sun-Hee C, Sun-Joong K, Hyuk-Joon K. Chronological study of antibiotic resistances and their relevant genes in Korean avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. J of Clin Microbiol 2007; 45: 3309-3315.
53. Vanni M, Meucci V, Tognetti R, Cagnardi P, Montesissa C, Piccirillo A,

- Rossi AM, Di Bello D, Intorre L. Fluoroquinolone resistance and molecular characterization of *gyrA* and *parC* quinolone resistance-determining regions in *Escherichia coli* isolated from poultry. *Poult Sci* 2014; 93:856–863.
54. Poirel L, Cattoir V, Nordmann P. Is plasmid-mediated quinolone resistance a clinically significant problem? *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 295–297.
55. Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby G. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998; 351: 797-799.
56. Vetting M, Hegde S, Fajardo J, Fiser A, Roderick S, Takiff H, Blanchard J. Pentapeptide repeat proteins. *Biochemistry* 2006, 45: 1-10.
57. Tran J, Jacoby G, Hooper D. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother* 2005a; 49: 118-125.
58. Tran J, Jacoby G, Hooper D. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother* 2005b; 49: 3050-3052.
59. Cattoir V, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance in Gram-negative bacterial species: an update. *Curr Med Chem* 2009; 16: 1028-1046.
60. Jacoby G, Cattoir V, Hooper D, Martínez-Martínez L, Nordmann P, Pascual A, *et al.* *qnr* gene nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 2297- 2299.
61. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby G, Macielag M, Abbanat D, Park C, *et al.* Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 2006a; 12: 83-88.
62. Hansen L, Johannesen E, Burmolle M, Sørensen A, Sørensen S. Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in

- Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 3332–3337.
63. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, *et al*. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 3354-3360.
64. Cattoir V, Poirel L, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 3801-3804.
65. Yue L, Jiang H, Liao X, Liu J, Li S, Chen X, *et al*. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in poultry and swine clinical isolates of *Escherichia coli*. Vet Microbiol 2008; 132: 414-420.
66. Huang S, Dai L, Xia L, Du X, Qi Y, Liu H, *et al*. Increased prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in chicken *Escherichia coli* isolates from 2001 to 2007. Foodborne Pathog Dis 2009; 6: 1203-1209.
67. Ma J, Zeng Z, Chen Z, Xu X, Wang X, Deng Y, *et al*. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6')-ib-cr*, and *qepa* among ceftiofur-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from companion and food-producing animals. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53: 519-524.
68. Cerquetti M, García-Fernández A, Giufrè M, Fortini D, Accogli M, Graziani C, *et al*. First report of plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrS1* in an *Escherichia coli* strain of animal origin in Italy. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53: 3112-3114.
69. Zhao J, Chen Z, Chen S, Deng Y, Liu Y, Tian W, *et al*. Prevalence and dissemination of *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from animals,

- farmworkers, and the environment. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 4219-4224.
70. Kmet V, Kmetová M. High level of quinolone resistance in *Escherichia coli* from healthy chicken broilers. *Folia Microbiol* 2010; 55: 79-82.
71. Fortini D, Fashae K, García-Fernández A, Villa L, Carattoli A. Plasmid-mediated quinolone resistance and β -lactamases in *Escherichia coli* from healthy animals from Nigeria. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 1269-1272.
72. Veldman K, Cavaco L, Mevius D, Battisti A, Franco A, Botteldoorn N, *et al.* International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 1278-1286.
73. Tamang M, Nam H, Chae M, Kim S, Gurung M, Jang G, *et al.* Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants among *Escherichia coli* isolated from food animals in Korea. *Foodborne Pathog Dis* 2012; 9: 1057-1063.
74. Gosling R, Clouting C, Randall L, Horton R, Davies R. Ciprofloxacin resistance in *E. coli* isolated from turkeys in Great Britain. *Avian Pathol* 2012; 41: 83-89.
75. Kawanishi M, Ozawa M, Hiki M, Abo H, Kojima A, Asai T. Detection of *aac(6')-Ib-cr* in avian pathogenic *Escherichia coli* isolates in Japan. *J Vet Med Sci* 2013; 75: 1539–1542.
76. Ahmed AM, Shimamoto T, Shimamoto T. Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers. *Int J Med Microbiol* 2013; 303: 475-483.

77. Randall LP, Mueller-Doblies D, Lemma FL, Horton RA, Teale CJ, Davies RH. Characteristics of ciprofloxacin and cephalosporin resistant *Escherichia coli* isolated from turkeys in Great Britain. *Br Poult Sci* 2013; 54: 96-105.
78. Xie R, Huo S, Li Y, Chen L, Zhang F, Wu X. Molecular epidemiological survey on quinolone resistance genotype and phenotype of *Escherichia coli* in septicemic broilers in Hebei, China. *Poult Sci* 2014; 93: 335–339.
79. Kilani H, Abbassi MS, Feriani S, Mansouri R, Sghaier S, Ben Salem R, *et al.* Occurrence of *bla* CTX-M-1, *qnrB1* and virulence genes in avian ESBL-producing *Escherichia coli* isolates from Tunisia. *Front Cell Infect Microbiol* 2015; 5: doi: 10.3389/fcimb.2015.00038.
80. Armas-Freire P, Trueba G, Proaño-Bolaños C, Levy K, Zhang L, Marrs C, *et al.* Unexpected distribution of *qnrB* gene in *E. coli* isolates from different origins in Ecuador. *Int Microbiol* 2015; 18: 85-90.
81. Li Y, Chen L, Wu X, Huo S. Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers. *Poult Sci* 2015; 94: 601-611.
82. Oh J, Kwon Y, Tamang M, Jang H, Jeong O, Lee H, Kang M. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* Isolates from wild birds and chickens in South Korea. *Microb Drug Resist* 2016; 22: 69-79.
83. Literak I, Dolejska M, Janoszowska D, Hrusakova J, Meissner W, Rzycka H, *et al.* Antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria, including strains with genes encoding the extended-spectrum β -lactamase and QnrS in waterbirds on the Baltic Sea Coast of Poland. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76: 8126–34.
84. Tausova D, Dolejska M, Cizek A, Hanusova L, Hrusakova J, Svoboda O, *et al.* *Escherichia coli* with extended-spectrum β -lactamase and plasmid-

- mediated quinolone resistance genes in great cormorants and mallards in Central Europe. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 1103–1107.
85. Unión Nacional de Avicultores. Indicadores económicos. CD.MX. (México): UNA, 2016.
86. Martínez ACI, Rosario CC. Resistencia antimicrobiana en cepas de *Escherichia coli* aislada de aves de importación, traspatio y comerciales. Memorias XXXVII Convención Nacional ANECA. Puerto Vallarta (México): 2012.
87. San Martín B, Campos L, Bravo V, Adasne M, Borie C. Evaluation of antimicrobial resistance using indicator bacteria isolated from pigs and poultry in Chile. *Intern J Appl Res Vet Med* 2005; 3: 171-178.
88. Pantozzi F, Moredo F, Vigo G, Giacoboni G. Resistencia a los antimicrobianos en bacterias indicadoras y zoonóticas aisladas de animales domésticos en Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2010; 42: 49-52.
89. Lima-Filho J, Martins L, Nascimento D, Ventura R, Batista J, Silva A, *et al.* Zoonotic potential of multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* obtained from healthy poultry carcasses in Salvador, Brazil. *Braz J Infect Dis* 2013; 17: 54-61.
90. Koga VL, Scandorieiro S, Vespero EC, Oba A, de Brito BG, de Brito KCT, *et al.* Comparison of antibiotic resistance and virulence factors among *Escherichia coli* isolated from conventional and free-range poultry. *Biomed Res Int* 2015: 618752.
91. Rosario C, López C, Téllez I, Navarro O, Anderson R, Eslava C. Serotyping and virulence genes detection in *Escherichia coli* isolated from fertile and infertile eggs, dead-in-shell embryos, and chickens with yolk sac infection.

- Avian Dis 2004; 48: 791-802.
92. Ramírez-Barrera G. Serotipificación y detección de genes de virulencia en cepas de *Escherichia coli* aisladas de diferentes muestras obtenidas en una empresa avícola integrada (tesis de licenciatura). México (DF) México: UNAM, 2007.
93. Wiegand I, Hilpert K, Hancock R. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nat Protoc 2008; 3: 163-175.
94. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Document M100-S17. Wayne (PA): CLSI, 2012.
95. Silva-Sanchez J, Barrios H, Reyna-Flores F, Bello-Diaz M, Sanchez-Perez A, Rojas T, *et al.* Prevalence and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates in Mexico. Microb Drug Resist 2011; 0:1-8.
96. Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, Pascual A, García I, Martínez-Martínez L. Correlation of quinolone resistance levels and differences in basal and quinolone-induced expression from three *qnrA*-containing plasmids. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 440–445.
97. Morgan-Linnell SK, Boyd LB, Steffen D, Zechiedrich L. Mechanisms accounting for fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53: 235–242.
98. Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC. *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States. Antimicrob Agents Chemother 2006b; 50: 2872–2874.

99. Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy C, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 394-397.
100. Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. Prevalence in the United States of *aac(6')-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3953-3955.
101. Sáenz Y, Zarazaga M, Briñas L, Lantero M, Ruiz-Larrea F, Torres C. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, foods, and humans in Spain. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 18: 353-358
102. Bywater R, Deluyker H, Deroover E, de Jong A, Marion H, McConville M, *et al.* A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and commensal bacteria isolated from food-producing animals. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 744–754.
103. Jiang H, Lü D, Chen Z, Wang X, Chen J, Liu Y, *et al.* High prevalence and widespread distribution of multi-resistant *Escherichia coli* isolates in pigs and poultry in China. *Vet J* 2011; 187: 99-103.
104. Zhao S, Blickenstaff K, Bodeis-Jones S, Gaines SA, Tong E, McDermott PF. Comparison of the prevalences and antimicrobial resistances of *Escherichia coli* isolates from different retail meats in the United States, 2002 to 2008. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78:1701-1707.
105. Tadesse D, Zhao S, Tong E, Ayers S, Singh A, Bartholomew M, McDermott P. Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States 1950–2002. *Emerg Infect Diseases* 2012; 18: 741-749.

106. Mainali C, McFall M, King R, Irwin R. Evaluation of antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* isolates of broiler chickens at slaughter in Alberta, Canada. *J Food Prot* 2013; 76: 2045-2051.
107. Wu Q, Xi M, Lv X, Xu Y, Feng Y, Li Q, *et al.* Presence and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* recovered from retail chicken in China. *J Food Prot* 2014; 77: 1773-1777.
108. Salehi T, Bonab S. Antibiotics susceptibility pattern of *Escherichia coli* strains isolated from chickens with colisepticemia in Tabriz Province, Iran. *Int J Poult Sci* 2006; 5: 677-684.
109. Li L, Jiang Z, Xia L, Shen J, Dai L, Wang Y, *et al.* Characterization of antimicrobial resistance and molecular determinants of beta-lactamase in *Escherichia coli* isolated from chickens in China during 1970–2007. *Vet Microbiol* 2010; 144: 505-510.
110. Smet A, Martel A, Persoons D, Dewulf J, Heyndrickx M, Boudewijn C, *et al.* Diversity of extended-spectrum β -lactamases and class C β -lactamases among cloacal *Escherichia coli* isolates in Belgian broiler farms. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 1238-1243.
111. Mohamed MA, Shehata M, Rafeek E. Virulence genes content and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* from broiler chickens. *Vet Med Int* 2014; 195189.
112. Usui M, Ozawa S, Onozato H, Kuge R, Obata Y, Uemae T, *et al.* Antimicrobial susceptibility of indicator bacteria isolated from chickens in Southeast Asian countries (Vietnam, Indonesia and Thailand). *J Vet Med Sci* 2014; 76: 685–692.
113. Bazile-Pham-Khac S, Truong Q, Lafont J, Gutmann L, Yang X,

- Osman M, Moreau N. Resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* isolated from poultry. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 1504-1507.
114. Kojima A, Ishii Y, Ishihara A. Extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3533-3537.
115. Tolun V, Küçükbasmacı O, Törümküney-Akbulut D, Catal C, Ang-Kücüker M, Ang O. Relationship between ciprofloxacin resistance and extended-spectrum beta-lactamase production in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 72-75.
116. Poirel L, Van De L, Mammeri H, Nordmann P. Association of plasmid-mediated quinolone resistance with extended-spectrum beta-lactamase VEB-1. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3091–3094.
117. Jiang Y, Zhou Z, Qian Y, Wei Z, Yu Y, Hu S, Li L. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 1003–1006.
118. Carattoli A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 2227-2238.
119. Marcusson LL, Frimodt-Moller N, Hughes D. Interplay in the selection of fluoroquinolone resistance and bacterial fitness. *PLoS Pathog* 2009; 5: e1000541.
120. Baker S, Duy PT, Nga TV, Dung TT, Phat VV, Chau TT, *et al.* Fitness benefits in fluoroquinolone-resistant *Salmonella typhi* in the absence of antimicrobial pressure. *Elife* 2013; 2: e01229.

121. Lee A, Mao W, Warren MS, Mistry AS, Hoshino K, Okumura R, *et al.*
Interplay between efflux pumps may provide either additive or multiplicative
effects on drug resistance. *J Bacteriol* 2000; 182: 3142–3150.