



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA COLISTINA A
PARTIR DE AISLAMIENTOS DE *Escherichia coli* EN
CERDOS DE MÉXICO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:
PAULINA FRAGOSO ZAMORA**

ASESORES:

**MVZ MC MARÍA DEL ROSARIO ESPERANZA GALVÁN PÉREZ
PHD MANUEL CHIRINO TREJO**



CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO

2020



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.

DEDICATORIA

A mi familia, por ser mi principal motivación y acompañarme en todo momento. A la UNAM por brindarnos las herramientas para ser grandes profesionistas, por darme la oportunidad de conocer grandes profesores, amigos y obtener experiencias maravillosas que llevo en el corazón.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis hermanas, Desaili y Evelyn por creer en mí, ser mi inspiración y fuente de alegría. A mis papás que se han esforzado por ser buenos guías y apoyo para alcanzar mis objetivos. Muy especialmente a mis tías Esther y Lourdes, por estar siempre para mí y ser personas excepcionales.

Doctora Esperanza Galván, gracias por ser mi gran amiga y asesora de tesis. Tantas experiencias que vivimos, conocimientos compartidos y sobre todo los consejos que me han ayudado a crecer tanto de forma profesional como persona. No hay palabras suficientes para expresar mi gratitud hacia usted y su familia.

A mis amigas y compañeros que compartimos tantas clases, alegrías, hicieron los días de estudio divertidos e interesantes. Me quedo con gratos recuerdos de todos ustedes. Abi, gracias por ser mi dosis de felicidad y apoyo al terminar las clases. Viri, cuanto agradezco a la vida por permitirnos coincidir en el laboratorio, mi lugar favorito, cuanto aprendimos y reímos juntas.

También me gustaría reconocer el gran apoyo que obtuve de mi jurado, gracias por cada una de sus observaciones que ayudaron a enriquecer este trabajo. De igual forma, a los doctores Marco Herradora y Roberto Martínez del DMCZ por sus aportaciones y su tiempo.

Gracias Nicki, que me motivaste a estudiar Medicina Veterinaria.

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
La porcicultura en México	2
Escherichia coli en el cerdo	3
Tratamiento contra <i>Escherichia coli</i> en cerdos	5
Resistencia a los antimicrobianos	6
Acciones contra la resistencia antimicrobiana	7
Colistina	8
Colistina en el cerdo	9
Resistencia antimicrobiana de <i>Escherichia coli</i> a la colistina	10
Hipótesis	12
Objetivo	12
Justificación	12
MATERIAL Y MÉTODOS	13
Aislamientos de <i>E. coli</i>	13
Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)	14
Preparación del antibiótico	15
Microdilución en caldo	16
Lectura de Resultados	16
Análisis estadístico	17
RESULTADOS	18
DISCUSIÓN	24
CONCLUSIÓN	29
REFERENCIAS	30

RESUMEN

FRAGOSO ZAMORA PAULINA. Evaluación de la resistencia a la colistina, a partir de aislamientos de *Escherichia coli* en cerdos de México (bajo la dirección de MVZ MC María del Rosario Esperanza Galván Pérez y MVZ PhD Manuel Chirino Trejo).

La colistina es un antibiótico que ha sido utilizado en la producción porcina como tratamiento y prevención de enfermedades digestivas, entre ellas, las causadas por *Escherichia coli*. Este trabajo permite conocer la frecuencia de resistencia en a la colistina en México, obtenida mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC por sus siglas en inglés) de acuerdo con las recomendaciones del CLSI-EUCAST (MIC <2 µg/mL). Fueron 302 aislamientos provenientes de cerdos enfermos pertenecientes a granjas tecnificadas, remitidos al Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdo en el periodo del 2003 al 2018. Los aislamientos recuperados corresponden a Veracruz (48 %), Puebla (38 %), Ciudad de México (7 %), Estado de México (3 %), Querétaro (3 %) y Aguascalientes (1 %). En México el nivel de resistencia a este antibiótico fue de 43.04 %, con una MIC₅₀ y MIC₉₀ de 2 µg/mL y 128 µg/mL, respectivamente. Veracruz fue el estado con mayor resistencia (46.87 %) y con la MIC₉₀ más alta (128 µg/mL). En el estado de Puebla la resistencia fue de 35.92 % con una MIC₉₀ fue de 16 µg/mL, mientras que para la zona centro se observa como gradualmente la MIC va siendo mayor. En la Ciudad de México un asilado del 2006 tenía una MIC de 0.5 µg/mL para el 2017-2018 la MIC₅₀ fue de 4 µg/mL y la MIC₉₀ de 8 µg/mL. Los resultados obtenidos sugieren que el uso y exposición prolongado a un antibiótico generará resistencia.

INTRODUCCIÓN

La porcicultura en México

La carne es un alimento consumido a nivel mundial, con el cual a finales del 2018 se alcanzaron los 65 kg *per capita*. Durante ese año en México se consumió el 3.2 % de la carne producida a nivel mundial y ocupó el sexto puesto con más de 8.5 millones de toneladas de carne de res, cerdo y pollo consumidas. En cuanto a la producción, México es el séptimo lugar en producción de cárnicos con aproximadamente 6.7 millones de toneladas producidas durante el 2018, lo que representa un crecimiento del 3.2 % respecto al año 2017. (1)

Dentro del sector pecuario en México, la porcicultura ocupa el tercer lugar en importancia por el valor y volumen de producción que genera. Pues al ser una carne de calidad, que permite incluirla en una gran variedad de platillos de la gastronomía mexicana; viéndose reflejado en el consumo *per capita* en México para el año 2018 con un consumo de 17.2 kg. (1,2)

A nivel mundial durante el 2018, la carne de cerdo fue la más consumida sobre la carne de bovino y pollo, con una producción de entre 112.52 y 112.96 millones de toneladas respectivamente. (1) México es el décimo productor mundial de carne de cerdo, los principales estados productores fueron Jalisco, Sonora, Puebla, Yucatán y Veracruz. (2) Se espera que la demanda de alimentos de origen animal en los países en vías de desarrollo, como México, aumente a más del doble para el 2030, ya que a medida que aumentan los ingresos, crece la demanda de una mayor variedad de alimentos de valor y calidad como la carne, el huevo y la leche. Estos cambios en el consumo y el crecimiento demográfico han llevado a grandes aumentos en la demanda lo que exige a la producción porcina ser más eficiente, mejorar los índices de productividad, la intensificación, la aplicación de mejores tecnologías de producción y comercialización. (3)

Uno de los principales problemas que tiene la producción intensiva es el manejo sanitario, que tiene como finalidad la prevención y el control de enfermedades en las diferentes etapas productivas. En la actualidad se cuenta con herramientas diagnósticas, como la bacteriología veterinaria, que permite al médico veterinario zootecnista resolver los problemas que afectan la salud animal, pública y, por ende, la producción.

Una de las etapas en las que se debe tener especial cuidado del estatus sanitario es durante las primeras semanas de vida del lechón, ya que la presentación de enfermedades repercute de forma directa sobre el número de lechones destetados, para el posterior crecimiento en la engorda. Las patologías digestivas son una de las principales causas de mortalidad en esta etapa. (4) La presentación de diarrea asociada con *Escherichia coli* puede ocurrir en lechones a pocos días del nacimiento o bien, después del destete. En ocasiones la presentación clínica se manifiesta como toxemia, en la llamada “enfermedad del edema”. (5)

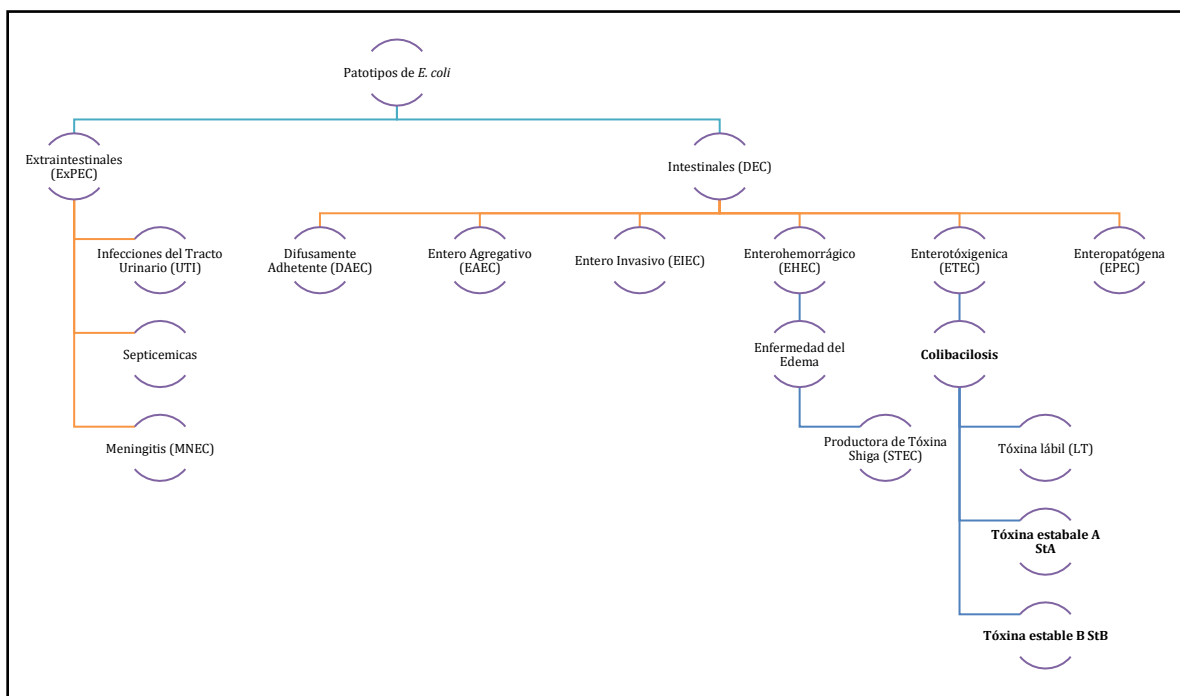
Escherichia coli en el cerdo

Existe una gran variedad de *E. coli* presentes en los cerdos y su entorno, es una causa de enfermedad tanto intestinal como extraintestinal y en otras patologías, como mastitis en las cerdas. Los animales son colonizados en los primeros días de vida, (6) ya que *E. coli* se encuentra como microbiota en la piel y las glándulas mamarias de la cerda, de este modo es ingerida por los lechones lactantes, los cuales tienen poca inmunidad adquirida vía calostro, por lo tanto, la calidad del calostro será vital para la protección de los lechones; por esta razón, es más común que camadas de cerdas primerizas presenten la enfermedad causada por esta bacteria. (5,6)

E. coli pertenece a la familia Enterobacteriaceae, es un bacilo Gram negativo, flagelado, móvil, no esporulado, generalmente fermentador de la lactosa, anaerobio facultativo, forma colonias de lisas a mucoides. Tiene diversos factores de virulencia, entre ellos fimbrias (permiten la unión a receptores específicos en la superficie del intestino delgado), enterotoxinas (exotoxinas), endotoxinas y cápsula. Es parte de la microbiota intestinal de humanos y animales, coloniza el intestino a pocas horas del nacimiento, sin embargo, también puede ser patógena cuando el huésped se encuentra inmunodeprimido, ocasionando la enfermedad. Las cepas se han dividido en patógenas intestinales o diarreagénicas (DEC) y extraintestinales (ExPEC), estas últimas pueden causar meningitis, septicemia e infecciones del tracto urinario (Figura 1). (5, 7,8)

Las cepas DEC se han agrupado en seis patotipos, cada uno definido por factores de virulencia y rasgos fenotípicos, los cuales son *E. coli* Enteropatógena (EPEC), Enterohemorrágica (EHEC), EnteroInvasiva (EIEC), Adherencia Difusa (DAEC), EnteroAgregativa (EAEC) y Enterotoxigénica (ETEC), (5,7–9) de los cuales el patotipo más

relevante en el ganado porcino es ETEC, ya que causa diarrea a los lechones durante la etapa de maternidad y al destete. Se caracteriza por disponer simultáneamente de dos factores de virulencia: debe producir al menos una adhesina para la colonización del intestino y una enterotoxina, (6) las cuales son elaboradas localmente en el intestino delgado y pueden tener efectos locales o sistémicos. Las toxinas producidas por ETEC en cerdos son: toxina lábil (LT), toxina estable A (StA), toxina estable B (StB) y vero toxina (toxina tipo Shiga, Stx2E), esta última es la responsable de los efectos vasculares sistémicos de la enfermedad del edema, mientras que las primeras tres actúan localmente, causando hipersecreción de líquido desde el intestino.(5,7–9) Frecuentemente se ha identificado la toxina StA en aislados ETEC provenientes de lechones en los primeros días de vida, mientras que la frecuencia de identificación de la LT en cerdos afectados, se incrementa con la edad. (6)



Las pruebas moleculares y la serotipificación son la manera de distinguir las cepas patógenas de la microbiota, ya que no hay pruebas bioquímicas, microbiológicas o en animales para su diferenciación. (7) En 1944, Kauffman propuso la clasificación de *E. coli* mediante suero de conejos inmunizados con variedades de los antígenos O (somático), H (flagelar) y K (capsular) (Figura 2). Generalmente sólo se enumeran la combinación de los antígenos O y

H. (9,10) Actualmente se conocen un total de 188 antígenos somáticos, 53 flagelares y 60 capsulares. (10) Otra clasificación está dada por las fimbrias (antígeno F), las cuales son las adhesinas más comunes, de naturaleza proteica que la bacteria emplea para fijarse a los enterocitos, favoreciendo así la colonización. (6)

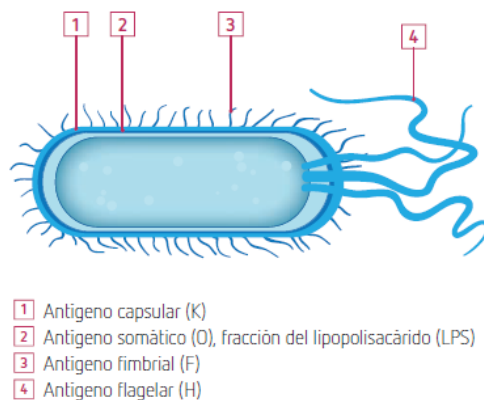


Figura 2 Principales antígenos para la clasificación de *E. coli* (6)

Debido a la preocupación mundial por la resistencia antimicrobiana, se han buscado alternativas para disminuir el uso de antibióticos, la implementación de pre y probióticos sobre la microbiota intestinal en los animales más jóvenes para completar su maduración. El proceso de adquisición de ésta durante los primeros días de vida del lechón tiene gran importancia, por lo que debe ser un proceso paulatino y a partir de una reproductora sana. (5,6)

Tratamiento contra *E. coli* en cerdos

La administración de antimicrobianos es frecuente para el tratamiento contra *E. coli*, a lo largo de la historia se han agregado diversos antibióticos al alimento o al agua de bebida, con fines terapéuticos y profilácticos, (5) así como el empleo de soluciones de electrolitos para controlar la deshidratación. Es importante tener en cuenta que los primeros días de vida son fundamentales en el proceso de adquisición de la microbiota y que los tratamientos con antibióticos, especialmente si se administran por vía oral, van a alterar de forma importante este proceso, por lo que la administración de probióticos y prebióticos, permite modificar la microbiota y favorecer las condiciones de salud en el hábitat intestinal. Respecto al uso de antibióticos, cabe destacar que, dado el incremento en el interés por controlar la resistencia antimicrobiana, comienzan a existir restricciones en el empleo profiláctico de antibióticos,

por lo tanto es necesario trabajar conjuntamente en aspectos como el ambiente de las instalaciones en las que son alojados, la limpieza de estas salas, el manejo de los animales para evitar el estrés de los lechones, proveer inmunidad específica e inespecífica y cuidar la dieta para favorecer a la microbiota intestinal. El aislamiento bacteriano permite conocer la sensibilidad antimicrobiana a diversos antibióticos del mercado. (5,6)

Resistencia a los antimicrobianos

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) según la Organización Mundial de la Salud (OMS) es el fenómeno por el cual un microorganismo (bacterias, virus, hongos o parásitos) deja de ser destruido o inhibido por un antimicrobiano al que era sensible, comprende la resistencia a antibacterianos, antivirales, antiparasitarios y fungicidas. La RAM es consecuencia de la capacidad de ciertos microorganismos para neutralizar el efecto de los medicamentos, como los antibióticos, que surge por la mutación del microorganismo o por la adquisición de un gen o genes de resistencia. Es así como, la resistencia a los antibióticos se manifiesta en bacterias que producen ciertas mutaciones en respuesta al uso de antibióticos, a consecuencia del uso inadecuado de los medicamentos, los medicamentos de mala calidad, las prescripciones erróneas, las deficiencias de la prevención y el control de las infecciones. A su vez, la deficiente vigilancia del uso de antibióticos, así como las limitaciones en diagnósticos terapéuticos y preventivos dificultan el control. (11,12)

La resistencia a los antibióticos particularmente es una problemática a nivel mundial y la importancia de su estudio es tanto por las fallas terapéuticas en animales, como por el impacto que representa en la salud pública. Por ello, actualmente existe un significativo interés por conocer los niveles de resistencia, efectuar un control cuidadoso y entender cuáles son los factores que influyen en ellos. Un uso excesivo o inadecuado de los antibióticos puede conducir al desarrollo de organismos resistentes a la acción de estos fármacos tanto en bacterias de la microbiota y cepas patógenas, tal y como se ha podido observar en el transcurso de las últimas décadas. (13,14)

La base de la resistencia bacteriana es la selección de cepas resistentes a ciertas concentraciones de antibiótico, dado por la mutación que permite que algún mecanismo bacteriano cambie lo suficiente para que el antibiótico no pueda actuar. Sobre esta mutación actúa luego la selección ejercida por el antibiótico. Las bacterias pueden tener variación de

la susceptibilidad a concentraciones del antibiótico, por lo que, estudiar la susceptibilidad a través de su concentración mínima inhibitoria (MIC por sus siglas en inglés), permite estimar la eficacia “*in vivo*” de un antibiótico. Cuando las concentraciones que puede alcanzar un antimicrobiano en el organismo no superan la MIC, las bacterias tienen la posibilidad de sobrevivir y dar lugar a una resistencia adquirida; ya que el antibacteriano actúa seleccionando entre un microorganismo resistente y uno susceptible. Hay otro tipo de resistencias, las denominadas resistencias intrínsecas, aquellas que son parte constitutiva de la bacteria, por ejemplo, las diferencias de membrana entre bacterias (13, 15)

Acciones contra la resistencia antimicrobiana

Como se ha mencionado, muchos antimicrobianos que son utilizados para la prevención y el tratamiento de enfermedades en la ganadería son usados también en medicina humana, por lo que existe el riesgo de selección y propagación de bacterias resistentes a los antimicrobianos a través de los productos de origen animal. Esto ha incitado a los gobiernos a adoptar acciones al respecto. (16)

Para conocer la relación entre la resistencia a los antimicrobianos y el uso de medicamentos en animales de consumo, se deben estudiar las características epidemiológicas relacionadas con los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo, la aptitud y la transmisión de la resistencia presentes en las bacterias resistentes, para así proporcionar un panorama integral de dicha resistencia e identificar la necesidad de gestionar el riesgo de los medicamentos antimicrobianos. (16)

Para el monitoreo de la resistencia se utiliza comúnmente el análisis de la microbiota, ya que los microorganismos que los componen están expuestos a la presión de los antimicrobianos administrados, ya sea de manera terapéutica o como promotores del crecimiento a su huésped. La importancia de dicha evaluación es que una bacteria comensal puede transferir sus genes de resistencia a bacterias patógenas. Este fenómeno está dado principalmente en bacterias Gram negativas (17).

En este sentido, los antimicrobianos utilizados se ven comprometidos y uno de ellos es la colistina, ya que está en la lista de la OMS como crítico, al ser considerado como uno de los últimos recursos para combatir infecciones en medicina humana, no obstante, en medicina

veterinaria ha sido usado durante más de 50 años, principalmente en la cría de cerdos y aves. Otro factor alarmante es que en el 2015 se detectó el plásmido *mcr-1* de un aislamiento de *E. coli*, en una granja de cerdos, por lo que el riesgo de producir resistencia a este antibiótico en salud humana sea mayor y limite a su vez, el uso de la colistina en medicina veterinaria. (18)

Por ahora, las cepas bacterianas con genes *mcr* que han sido detectadas pertenecen a familias Enterobacteriaceae y Pseudomonas (19). Es aquí el peligro que representa, dado que pudiera dejar de ser un antibiótico con acción contra bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp. y otras cepas de *E. coli* como la causante del síndrome urémico en humanos. (20)

Colistina

La colistina es un polipéptido catiónico perteneciente a la familia de las polimixinas producida por la bacteria *Paenibacillus polymyxa* var *colistinus*, cuyo mecanismo de acción está basado en la lisis de membrana externa al modificar el lipopolisacárido (LPS) en bacilos Gram negativos por las propiedades tenso activas que le confiere su estructura química, así mediante interacción electrostática con el LPS causando la interrupción de la membrana celular externa que resulta en un aumento de la permeabilidad de la envoltura celular, modifica la estructura de la pared, lo que permite el acceso del fármaco y en consecuencia su destrucción. (21,22). Otros mecanismos que se han propuesto es una vía de contacto vesícula-vesícula y una vía de muerte por radicales hidroxilo. (23,24)

La muerte bacteriana por radicales hidroxilo es debido a la rápida actividad antimicrobiana contra los aislamientos de *E. coli* sensibles y resistentes a múltiples fármacos a través de la reducción de peróxido de hidrógeno por hierro ferroso (Fe^{2+}), la cual podría provocar daños oxidativos en el ADN bacteriano, proteínas, lípidos y causar la muerte celular, sin embargo, esta característica de la colistina aún no se ha evaluado en la práctica clínica. (23,24) Aunque este antibiótico se ha usado desde la década de 1960 para el tratamiento de infecciones ocasionadas por bacterias Gram negativas, su uso declinó significativamente después de la introducción de antibióticos con menor toxicidad, tales como cefalosporinas y los carbapems. (25,26)

Dado que la industria farmacéutica no ha generado nuevas sustancias antibacterianas y el rápido desarrollo de multi-resistencia en bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* a otras familias de antibióticos actuales, se ha renovado recientemente el interés en la colistina para el tratamiento de infecciones por Gram negativos en muchos países, lo que ha llevado a un uso excesivo de esta tanto en medicina humana como veterinaria. Durante la última década, su investigación experimentó un efecto muy significativo. La colistina está clasificada entre los Antimicrobianos Críticamente Importantes de Alta Prioridad para la medicina humana por la OMS, y se considera el último recurso antimicrobiano para el tratamiento de infecciones por bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas en humanos y en 2014 se incluyó en el panel antimicrobiano obligatorio de vigilancia europea de las *Enterobacteriaceae* de origen animal. (22,27–31)

Debido al aumento en el uso de la colistina se ha evidenciado la emergencia de resistencia, cuyo mecanismo es principalmente cromosómico, sin embargo, ya se ha descrito la resistencia a colistina codificada en plásmidos. (21) Debido a su uso en la ganadería se ha visto que el gen móvil de resistencia a la colistina (*mcr*) está presente en mayor proporción que lo reportado en humanos. (19) De acuerdo con diversos autores, la tasa de resistencia a la colistina de *E. coli* fue mayor en cerdos en comparación con otras producciones animales. (27)

Colistina en el cerdo

La colistina se ha utilizado en medicina veterinaria durante décadas y todavía se administra en todos los continentes. Es utilizada como promotor del crecimiento en ciertos países como China, India, Japón y Vietnam, pese a que se ha demostrado que las concentraciones sub inhibitorias de antibióticos utilizados para mejorar el crecimiento animal promueven la aparición de resistencia. La prevención de enfermedades debe basarse principalmente en medidas de manejo preventivo, como lo son la temperatura óptima, vacunación, saneamiento, condiciones de alojamiento, aplicación de reglas de bioseguridad, entre otras. (23,30)

El sulfato de colistina ha sido ampliamente usado por la industria, a pesar de la falta de cuantificación del uso de antimicrobianos, se han reportado altos porcentajes de usuarios o prescriptores en la mayoría de los países informantes. (30,32) Ha contribuido a la intensificación de las producciones modernas al asegurar el destete exitoso, mayores

densidades de los animales, como tratamiento de infecciones del tracto gastrointestinal causados por *E. coli*, ayuda a reducir las pérdidas económicas causadas por las infecciones como la diarrea neonatal, post-destete y la enfermedad del edema, enfermedades económicamente importantes en cerdos por las pérdidas resultado de alta mortalidad, morbilidad y afección a la tasa de crecimiento y costos post medicación. (23,32)

La colistina tiene un espectro antibacteriano estrecho con un efecto limitado a bacilos Gram negativos aerobios, como las enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores, sin embargo, hay patógenos naturalmente resistentes a colistina dentro de estos grupos, como *Proteus* spp. y *Serratia* spp. Quedan fuera de su cobertura también los cocos Gram positivos y los anaerobios. (21,23)

Resistencia antimicrobiana de *E. coli* a la colistina

Los mecanismos de resistencia a antibióticos en *E. coli* se adquieren mediante mutaciones puntuales a nivel del material genético cromosómico o transferencia horizontal de material genético entre especies relacionadas o diferentes, facilitada por algunos elementos móviles. Esta transferencia horizontal permite que los mecanismos se trasladen entre diferentes enteropatógenos y se diseminen rápidamente a nivel mundial. En general, entre los tipos de mecanismos moleculares de resistencia más comunes se encuentran: inactivación enzimática, alteraciones en el sitio blanco y alteraciones de la permeabilidad. (33)

El estudio de los mecanismos moleculares de resistencia en *E. coli* comensales, es importante debido a que estas bacterias estarían actuando como reservorio de los genes de resistencia antibiótica distribuidos en la comunidad. (29)

La resistencia adquirida a colistina se ha mantenido en bajos niveles a lo largo de los años a pesar del aumento significativo en su uso. Hasta hace poco se sabía que la resistencia en las polimixinas, en general, se daba por mutaciones a nivel cromosómico, no existían informes acerca de la transferencia horizontal de genes que otorgan resistencia a las mismas, para la colistina se explica por mutaciones en los genes que conducen a modificaciones en la capa de LPS, sitio de acción de esta molécula, que resultan en alteraciones en el objetivo y una unión reducida del antimicrobiano. Los cambios en LPS consisten en una modificación del

lípidos A, que reducen la carga negativa neta de estos y como consecuencia, aumentan la resistencia a la colistina. (23,30) En noviembre del 2015 se informó sobre la aparición de un nuevo mecanismo de resistencia a colistina a través de plásmidos, relacionado al gen *mcr-1* (Mobile Colistin Resistance), productor de una enzima responsable de la resistencia, por lo que se puede diseminar fácilmente la misma a otras bacterias, tiene acción en el lípido A, lo que conduce a una disminución de la afinidad de la colistina por el LPS. (19) En junio del 2016, se identificó un nuevo gen de resistencia a la colistina mediado por plásmidos, *mcr-2*, en aislados de *E. coli* de resistencia a la colistina de origen porcino y bovino en Bélgica. (29) El gen *mcr-2* se detectó con mayor prevalencia que el gen *mcr-1* entre *E. coli* resistente a colistina de origen porcino, actualmente se reportan ocho variantes del gen *mcr*. (23)

Hasta el momento no se han reportado brotes o muertes causadas por microorganismos portadores de este gen, si bien el riesgo mayor que se enfrenta es la diseminación de este gen mediante plásmidos a otras cepas más virulentas y si llegara a darse esta situación, el uso de colistina como estrategia farmacológica quedaría obsoleta con las implicancias de morbimortalidad que esto conlleva. (21)

Otro mecanismo descrito es la heteroresistencia, la cual se refiere a que las poblaciones bacterianas contienen una mayoría de bacterias inhibidas en concentraciones por debajo del punto de corte de sensibilidad, junto con otra población de microorganismos que son resistentes. Es decir, que la resistencia se disemina por la expansión clonal de un aislado resistente a la colistina (CST-R), (30) A pesar de esto, no se cuenta con un método estandarizado para su detección. En este contexto el antimicrobiano actuaría como agente de selección, eliminando la población más sensible y permitiendo la sobrevivencia de la fracción mutante, lo que podría deberse también a un fenómeno de persistencia. La exposición a concentraciones del fármaco insuficientes podría representar un factor de riesgo para el enriquecimiento *in vivo* de la población resistente y esto podría relacionarse con fracaso terapéutico. (21)

Hipótesis

Con el paso de los años, los aislamientos de *E. coli* provenientes de cerdos enfermos siguen presentando la misma resistencia a la colistina.

Objetivo

Conocer el nivel de resistencia de *E. coli* a la colistina mediante la determinación de la MIC en aislamientos provenientes de cerdos enfermos de producciones porcinas tecnificadas en México desde 2003 a 2018, ya que en México se desconoce el nivel de resistencia a este antibiótico.

Justificación

La colistina ha sido utilizada en la producción porcina para combatir enfermedades digestivas, sin embargo, en humanos es un antibiótico que recientemente ha tomado importancia como tratamiento contra infecciones por bacterias multirresistentes (29). Este trabajo permitirá conocer la variación del comportamiento de aislamientos de *E. coli* durante los últimos años frente a este antibiótico. (30,34–36)

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamientos de *E. coli*

Se recuperaron aislamientos de *E. coli*, resguardados en el cepario del Laboratorio de Diagnóstico del Departamento de Medicina Veterinaria y Zootecnia de Cerdos de la UNAM. Dichos aislamientos fueron obtenidos del estómago de animales enfermos con diagnóstico presuntivo a colibacilosis.

Los aislamientos se descongelaron para ser cultivados en caldo tripticasa soya como medios de enriquecimiento e incubados de 18 a 24 h a 37 °C, posteriormente se sembraron en agar McConkey, (Figura 3) en donde se observó la morfología colonial típica, tinción de Gram y la morfología microscópica como parte de la identificación. Adicionalmente, se realizaron pruebas bioquímicas: Triple azúcar hierro (TSI), Sulfuro Indol Motilidad (SIM), citrato, urea, Rojo de Metilo–Voges Proskauer (RM/VP) y carbohidratos correspondientes basadas en las tablas de identificación de los manuales Cowan and Steel's y Bergey's.



Figura 3 Recuperación de aislamientos de *E.coli*

A los aislamientos identificados como *E. coli* se les realizó la prueba de sensibilidad antimicrobiana a sulfato de colistina por el método de microdilución en caldo para obtener la MIC, conforme a las recomendaciones del CLSI-EUCAST y a la norma ISO 20776-1, usando como cepa control la *E. coli* ATCC 25922.

Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

Para conocer la sensibilidad de los aislamientos a la colistina se realizó la prueba de MIC por el método de microdilución en placa. Empleando placas de poliestireno de 96 pozos y con fondo en “U”, que tuvieron la distribución mostrada en la Figura 4.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		Concentración ($\mu\text{g/ml}$)										Control	
		128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	+	-
Aislamiento	A												
	B												
	C												
	D												
	E												
	F												
	G												
	H												

Figura 4 Distribución de las placas de trabajo

Preparación del inóculo

Una vez identificados se procedió a sembrar cada uno de los aislamientos en Agar Tripticasa Soya (TSA) para la preparación del inóculo por el método de cultivo líquido, el cual consistió en tomar 5 colonias de la placa de cultivo puro de 18 h de incubación y sembrarlas en 5 mL de caldo tripticasa soya (Figura 5), incubadas a 37 °C durante 2 a 3 h hasta conseguir una turbidez del 0.5 de la escala de MacFarland. (37)



Figura 5 Inoculación de caldo TS

Posteriormente, se hizo una dilución 1:100 en caldo Müeller-Hinton para obtener un inóculo final de 5×10^5 UFC/mL. El inóculo se agregó dentro de los primeros 15 minutos a su ajuste como se recomienda. (37) Se corroboró la concentración del inóculo mediante la dilución de 10 μ L de los aislados en 9.9 mL de solución salina, de la cual se sembraron 100 μ L en TSA para la comprobación de la concentración, así como pureza y viabilidad del cultivo.

Preparación del antibiótico

Tomando en cuenta los datos de potencia del polvo, pureza (HPLC) y cantidad de agua, proporcionados por el fabricante Sigma-Aldrich para el producto Colistin sulfate salt, Polymyxin E European Pharmacopeia (EP) Reference Standard, Y0000277, se utilizó la fórmula siguiente para obtener la cantidad de antimicrobiano para el volumen de diluyente necesario para la solución de trabajo:

$$\text{Volumen requerido (mL)} = \frac{\text{Antimicrobiano (mg)} \times \text{Potencia } (\mu\text{g/mg})}{\text{Concentración requerida } (\mu\text{g/mL})}$$

$$\text{Concentración requerida } (\mu\text{g/mL})$$

Se preparó una solución madre de sulfato de colistina en agua estéril quedando a una concentración de 256 μ g/mL. (Figura 6)



Figura 6 Solución de trabajo de Sulfato de Colistina

Microdilución en caldo

1. Se colocaron 50 μL de caldo Müller-Hinton en los 96 pozos de la placa.
2. En la primera fila de la placa se depositaron 50 μL de solución madre de sulfato de colistina. A partir de ésta se realizaron diluciones dobles hasta la fila 10. Así se partió de una concentración de 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
3. La fila 11 se utilizó para el control positivo, caldo de cultivo e inóculo bacteriano, para un volumen final de 100 μL .
4. La fila 12 con el control del antibiótico, medio de cultivo y antibiótico para un volumen final de 100 μL .
5. Se colocaron 50 μL de la fila 1 a la 10 del inóculo bacteriano, usando una pipeta multicanal.
6. Después de la inoculación se le colocó la tapa.
7. Se incubaron a 37 °C durante 18 a 20 h.

Lectura de Resultados

Para determinar el punto final, las placas se colocaron sobre un lector con espejo, en el que se refleja la parte inferior de la placa. (Figura 7). La MIC se registró como el valor de la última dilución que inhibió completamente el desarrollo bacteriano, para corroborar esto se sembró en TSA la última dilución en la que se observó turbidez o crecimiento al fondo del pocillo y la siguiente que no tuvo crecimiento para evidenciar que fuera sensible a la dilución observada. El procedimiento se realizó por duplicado.

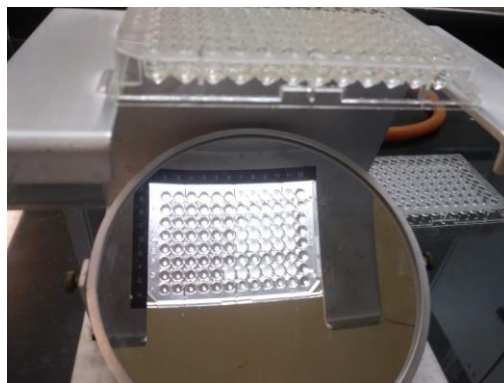


Figura 7 Lectura de la prueba

Para la interpretación de resultados se consideró el número de aislamientos recuperados por año y se analizó la información con una prueba estadística de χ^2 que se ajustó al número de muestras.

Análisis estadístico

Los datos fueron procesados con Microsoft Excel 2010, para ser organizados por año y estado al que pertenecen los aislados. Posteriormente, se realizó la prueba de χ^2 y la prueba exacta de Fisher con el programa JMP para evaluar estadísticamente el efecto del tiempo sobre las proporciones de resistencia. Los resultados de la diferencia con valor $p < 0.05$ se consideraron significativos.

RESULTADOS

Fueron recuperados un total de 316 aislados de *E. coli* provenientes de cerdos enfermos, los cuales fueron remitidos durante los años 2003 al 2018 al Laboratorio de diagnóstico del DMZC en la FMVZ-UNAM. A los 316 se les realizó la MIC, sin embargo, para el análisis solo se consideraron aquellas muestras con información del año de aislamiento, quedando un total de 302 aislados. Los valores obtenidos de la MIC por año se muestran en el Cuadro 1. Se puede apreciar el número de aislamientos por dilución obtenidos para el periodo del 2003 al 2018. Obteniéndose una MIC₅₀ de 2 µg/mL y MIC₉₀ 128 µg/mL.

Año	Distribución de la Concentración de Colistina (m/L)										No de <i>E. coli</i> totales/ año
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	
2003	4			1	3	1			1		10
2004		3									3
2005			1								1
2006	1	1			1	1	1	1		1	7
2007		1	1	3	4			1			10
2008	3		2	2	12	2				4	25
2009	2	2	4	1	4	1		1		1	16
2010	9	7	4	1		1	1	1		4	28
2011	7	2	2	3	7	6	1	1	2	7	38
2012	2	5	7	22	5	3	2			4	50
2013	11	3	3	5	1	1		3		11	38
2014	2		1	2	1		1			3	10
2015	4	3	3								10
2016	2	4	3	8	5	1		1			24
2017		1	1	1		1	1				5
2018		2	5	5	12	1			1	1	27
Sin año	7	1	1	2	1					2	14
No. de <i>E coli</i> totales/dilución	54	35	38	56	56	19	7	9	4	38	316

Cuadro 1 Distribución de la MIC por año de aislamiento

Una vez obtenidos los valores cuantitativos de la MIC para los 302 aislados, se convirtieron a valores cualitativos (sensible/resistente) utilizando el punto de corte proporcionado por el CLSI/EUCAST para colistina (susceptible 2, resistente >2 µg/mL), la resistencia para el total

de aislamientos de *E. coli* de México durante 2003 al 2018 fue de 43.04 % (130/302). En el Cuadro 2 se puede observar la frecuencia de resistencia obtenida por año.

NÚMERO DE MUESTRAS RESISTENTES POR AÑO		
AÑO	Muestras	Resistentes
2003	10	5
2004	3	0
2005	1	0
2006	7	5
2007	10	5
2008	25	18
2009	16	7
2010	28	7
2011	38	24
2012	50	14
2013	38	16
2014	10	5
2015	10	0
2016	24	7
2017	5	2
2018	27	15
SIN AÑO	14	3
TOTAL	316	133

Cuadro 2 Resistencia obtenida por año

A partir de los registros e historias clínicas se obtuvo información de la procedencia (Figura 8) de las muestras, siendo Veracruz (48 %) el estado que más casos remitió al DMZC, seguido de Puebla (38 %), Ciudad de México (7 %), Estado de México (3) y Querétaro (3 %) y Aguascalientes (1 %).

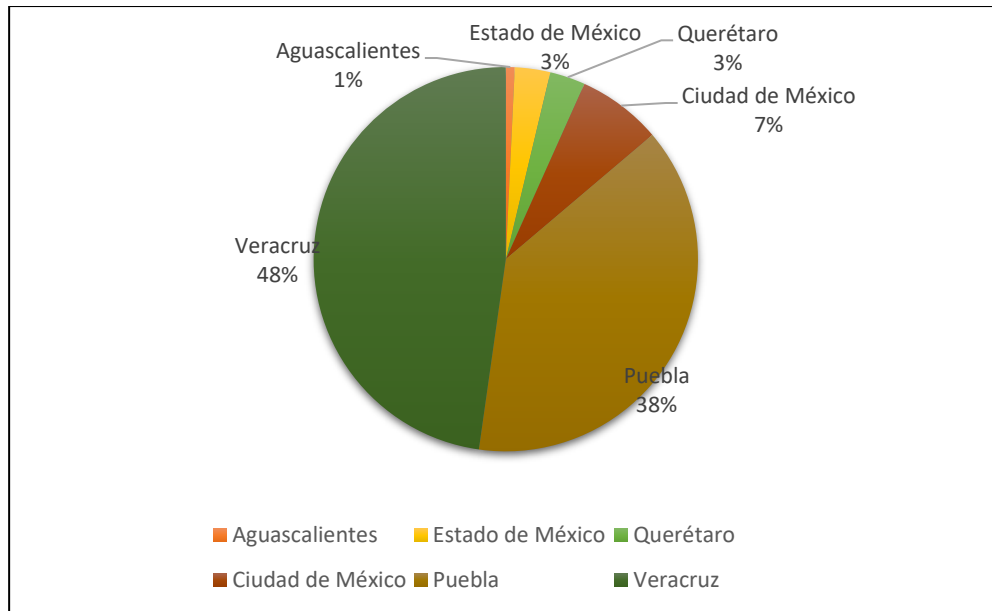


Figura 8 Distribución de muestras por estado

Los aislamientos de *E. coli* provenientes de Puebla y Veracruz, dos de los principales estados productores de carne de cerdo, tienen un porcentaje de resistencia a la colistina de 35.92 % y 46.87 %, respectivamente, una MIC50 de 2 µg/mL, sin embargo, en la MIC90 difieren con 6 µg/mL para Puebla y 128 µg/mL, para Veracruz. (Cuadro 3) El comportamiento de la resistencia en Veracruz (Figura 9) tiene más variación de la frecuencia de resistencia, ya que se observan durante 2008, 2011 y 2013 aumentos tras años de mayor sensibilidad.

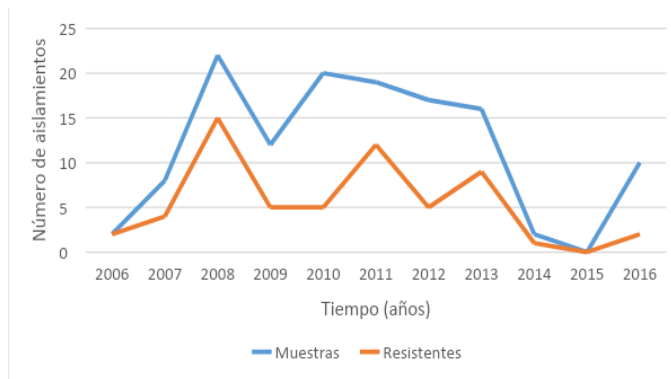


Figura 9 Comportamiento de la resistencia en Veracruz

En el estado de Puebla (Figura 10) se observó un aumento a la resistencia en 2010 y posteriormente la sensibilidad se ve aumentada hasta el periodo de 2014-2015 que se puede apreciar un aumento en la resistencia.

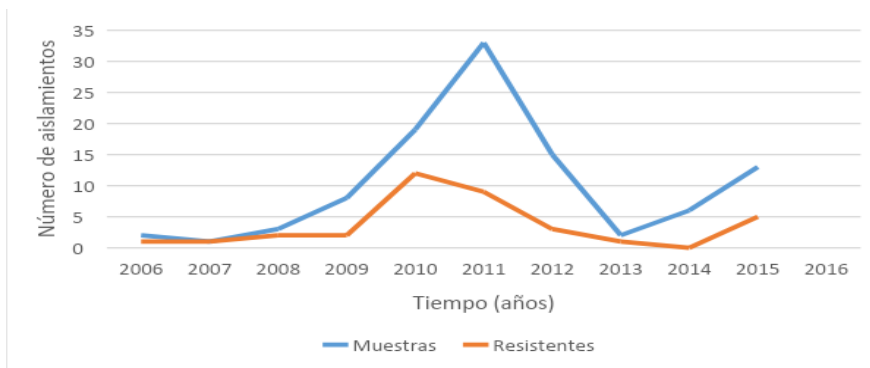


Figura 10 Comportamiento de la resistencia en Puebla

Los estados del centro del país mostraron una MIC50 y MIC90 en un intervalo reducido, sin embargo, mostraron una MIC90 dentro del intervalo de resistencia, aunque fueron estados con un número reducido de observaciones. (Cuadro 3)

Estado	Resistencia	MIC50	MIC90
	%	µg/mL	µg/mL
Veracruz	46.87	2	128
Puebla	35.92	2	16
Ciudad de México	57.89	4	8
Estado de México	50	2	4
Querétaro	37.5	1	16

Cuadro 3 Resistencia por estado

Con la finalidad obtener las frecuencias de resistencia a la colistina y evaluar el comportamiento de este antimicrobiano a través de los años en *E. coli*, se realizó el análisis de χ^2 , debido a que el número de muestras obtenidas en los primeros 4 años no era representativo y no se consideraron para este análisis. Los datos obtenidos con los 281 aislamientos restantes se agruparon de manera bienal. La diferencia observada fue de $p=0.003$ para el conjunto de períodos analizados. Los valores de resistencia, MIC50, MIC 90 y distribución de los aislados por periodo se muestran en el Cuadro 4.

	Periodo 1	Periodo 2	Periodo 3	Periodo 4	Periodo 5	Periodo 6
	2007-2008	2009-2010	2011-2012	2013-2014	2015-2016	2017-2018
Muestras (n)	35	44	88	48	34	32
MIC 50 (µg/mL)	4	1	2	2	1	4
MIC 90 (µg/mL)	128	128	128	128	4	8
% Resistencia	65.71	31.82	43.18	43.75	20.59	53.13

Cuadro 4 Análisis bienal. Resumen de resultados

Posteriormente, se compararon los resultados entre los años de cada bienio para conocer las diferencias entre sí, con la finalidad de validar que, pese a que el número de muestras varía entre periodos, se puede realizar el comparativo entre ellos y así validar el efecto del tiempo sobre la prevalencia de resistencia.

	2007-2008	2009-2010	2011-2012	2013-2014	2015-2016
Periodo	1	2	3	4	5
2	P= 0.0027				
3	P= 0.0241	P= 0.2078			
4	P= 0.0477	P= 0.239	P= 0.9491		
5	P= 0.0002	P= 0.2675	P= 0.0204	P= 0.0293	
6	P= 0.2940	P= 0.062	P= 0.3337	P= 0.4107	P= 0.006

Cuadro 5 Comparación estadística entre periodos

En la evaluación del comportamiento de la resistencia (Cuadro 4) observado a lo largo de la década, las proporciones de resistencia fueron mayores para los años 2007-2008 (65.71 %) y 2017-2018 (53.13 %).

Se observó que los valores de resistencia en los periodos 2, 3 y 4 (2009-2014) fueron similares y no mostraron una diferencia significativa (Cuadro 5), a pesar de la variación del número de muestras. Sin embargo, ocurre lo contrario con el periodo 5, dado que la frecuencia de resistencia disminuyó poco más de la mitad en estos años.

En el periodo 6 correspondiente a los años 2017-2018, hubo un aumento considerable de resistencia respecto al periodo anterior lo que se ve reflejado en el valor de $p=0.006$, lo cual nos indica que hay una diferencia significativa entre estos dos periodos, siendo resistentes en los 6 bienios.

La MIC50 para los períodos 2 y 5 están dentro del intervalo de sensibilidad, para los otros cuatro períodos, la MIC50 es mayor a $2 \mu\text{g/mL}$ y se consideran resistentes. Para la MIC90, los 6 períodos están dentro del rango de resistencia con valores de $128 \mu\text{g/mL}$ y los dos últimos de 4 y $8 \mu\text{g/mL}$ respectivamente.

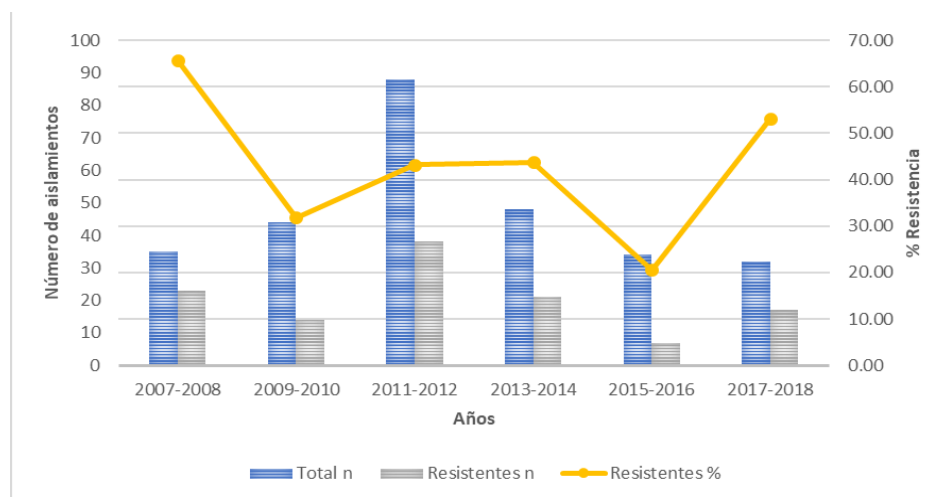


Figura 11 Comportamiento de la resistencia por periodo de tiempo

DISCUSIÓN

Se ha descrito que los antibióticos con más resistencia en la producción porcina son las tetraciclinas, sulfas y ampicilina, mientras que en el caso de la colistina es baja en comparación con otros antimicrobianos (38-40), sin embargo, en los resultados obtenidos en este trabajo para *E. coli* la resistencia fue de 43.04 %, con una MIC50 de 2 µg/mL y una MIC90 de 128 µg/mL, por lo que el nivel de resistencia en México es mayor a lo reportado en otros países que tienen sistemas de vigilancia y generan reportes, pero tienen un comportamiento similar a trabajos en los cuales se analizan aislamientos provenientes de animales enfermos y de granjas intensivas.

Delannoy (2017) en Francia, reportó que la resistencia a la colistina en aislamientos de *E. coli* obtenidos en el periodo comprendido entre 2009 y 2013 en cerdos enfermos fue del 100 %, obtuvieron en estos aislados MIC50 y MIC90 de 16 µg/mL, (41) en este estudio los niveles obtenidos de MIC50 fueron de 1 µg/mL (2009) y 2 µg/mL (2013), la resistencia observada en estos periodos también fue menor, sin embargo, en México la MIC90 fue 128 µg/mL, por lo que los aislamientos están más comprometidos.

Algunos países miembros de la Unión Europea en 2013 han reportado muy bajos porcentajes de resistencia a la colistina, tales como Portugal (2.5 %), Lituania (2.2 %), España (2 %), Austria, Dinamarca, Italia y Reino Unido (0.6 %) y Rumania (0.5%), mientras que los demás países miembros tienen 100 % de sensibilidad a este antimicrobiano (42). En México el nivel de resistencia (43 %) obtenido para el 2013 estaba por encima de lo reportado por la Unión Europea.

Para 2017, Austria e Italia mantuvieron su nivel de resistencia (0.6 %), mientras que países como Lituania, Portugal y España reportaron una mayor sensibilidad (1 %, 2.1 % y 0.6 %, respectivamente), sin embargo, Alemania (0.4 %), Grecia (0.6 %), Hungría (1.8 %) y Rumania (1.2 %) reportaron una mayor resistencia con respecto al 2013, (43) lo reportado por estos países representa una gran diferencia de lo encontrado en este trabajo, en el cual el nivel de resistencia en el periodo 6 (2017-2018) fue de 53.13 %, además, de ser uno de los periodos en donde hubo mayor resistencia en México.

Existen publicaciones de países de la Unión Europea, que permiten tener un panorama del comportamiento de la resistencia a través del tiempo y del tipo de animal (clínicamente sano o enfermo). Así, en Reino Unido, Enne, V. reportó una resistencia del 34.1 %, lo que es ligeramente menor a lo encontrado en este estudio en el estado de Puebla, dicho autor menciona que la prevalencia de resistencia antimicrobiana varía dependiendo de factores como el tipo de animal y la exposición a los antibióticos (40).

Habrún, en un estudio realizado en Croacia, obtuvo un 3 % de resistencia a la colistina de muestras aisladas entre 2009 y 2011, con una MIC₅₀ y MIC₉₀ de 0.094 µg/mL y 0.125 µg/mL, respectivamente. Estos aislamientos fueron considerablemente más sensibles a lo encontrado para este periodo en el presente trabajo, donde se observó un 46 % de resistencia, MIC₅₀ y MIC₉₀ de 2 µg/mL y 128 µg/mL, respectivamente.(38) En ambos estudios, los aislamientos fueron a partir de cerdos con signos clínicos, sin embargo, ellos mencionan que el nivel de resistencia a la colistina fue bajo debido a que era un antibiótico de recién introducción en el país (2 a 3 años previos a la realización de su investigación), a diferencia de que en México, se ha utilizado este antibiótico desde su introducción.

En España, García en el período del 2006 al 2016 reportó una resistencia de 76.9 % a la colistina en aislamientos de *E. coli* obtenidos a partir de cerdos en producción intensiva con signos clínicos; mientras que, en el presente trabajo, los resultados obtenidos en un periodo de tiempo similar y de animales bajo un sistema intensivo de producción se obtuvo un nivel de resistencia menor (43 %), así como en Puebla y Veracruz, estados más productivos del país (36 y 47 %, respectivamente). Un trabajo previo con aislamientos de 1997-1999, encontró una resistencia a la colistina de 26 %, además del posible efecto del tiempo en el incremento de la resistencia en España, están el factor de la intensificación de las granjas y el uso de antimicrobianos como determinantes de la presencia de resistencia. (39,44)

Existen diversos trabajos en donde se realizó la evaluación de la resistencia en China, Liming Lu en un estudio realizado en 2009, detectó una resistencia de 33.3 % en aislamientos, dato similar a lo reportado en este estudio en el mismo período. (46) Yi-Yun Liu encontró una resistencia del 20.9 % en aislamientos realizados de 2011 a 2014, mientras que Zhang en el periodo del 2013-2014 reportó una resistencia de 26.5 %. (19,45) En ambos estudios, los

resultados son menores a lo encontrado en el presente trabajo (43 %) para ese mismo periodo de tiempo analizado.

En este trabajo, en el quinto período (2015-2016) se observó el 21 % de resistencia, en las etapas de maternidad y destete, mientras que, en China Zhang reportó que el porcentaje de resistencia fue 19.2 % para maternidad y 40.7 % en destete. Cabe señalar que China es el país que más consume colistina para la producción porcina y reportan el uso de este antibiótico en todas las etapas, al realizar un seguimiento del efecto de la presión selectiva que ejerce el uso de antibióticos, el porcentaje de resistencia fue mayor en cerdos de engorda de muestras y de 85 % en cerdos adultos. (45)

En aislamientos de 1999 obtenidos en Japón había un 0.8 % de resistencia en *E. coli*, posteriormente, Kazuki y colaboradores reportaron para aislamientos recuperados entre 2001 y 2004, un 35.6 % de resistencia, por lo que concluyeron que estos niveles se ven influenciados por las tendencias de consumo de antibióticos y que en animales enfermos es mayor la resistencia en comparación con aislamientos provenientes de animales sanos, como se ha mencionado en otros países. (47)

Este trabajo describe la presencia de resistencia a la colistina en aislamientos de cerdos enfermos que estuvieron en granjas de producción intensiva. La colistina es el tratamiento de elección para la colibacilosis y la diarrea post destete (48), por lo cual es muy probable que los animales estuvieran previamente expuestos a este antibiótico, aunado a que no existe reporte de medicación previa en las historias clínicas. Sin embargo, la OIE ha elaborado tres versiones del Informe de los agentes microbianos utilizados en animales (49–51) lo cual nos da un panorama general del consumo de polipéptidos, grupo de antibióticos al que pertenece la colistina, en la región de las Américas. Este comportamiento es similar a los valores de resistencia mostrados en este trabajo, lo cual podría explicar porque al aumentar el consumo durante un periodo de tiempo, la resistencia aumenta y al disminuir la exposición a este antibiótico, los aislados mostraron mayor sensibilidad. Aunado a lo anterior, Villoldo en 2019 estudió la correlación entre la cantidad de fármaco consumida y el nivel de resistencia, encontrando en estas dos variables una tendencia similar, reafirmando así el que la resistencia a la colistina puede estar ligada al uso de este antibiótico, ya que la resistencia disminuyó cuando disminuyeron las ventas totales de colistina. (52)

Se ha comentado anteriormente el impacto que tiene el tipo de animal muestreado sobre los niveles de resistencia, las tendencias de consumo de los antibióticos y el grado de intensificación de las granjas de donde provienen los aislamientos. De igual forma, la literatura ofrece un panorama de la variación de resistencia entre las diversas poblaciones de un país, dado que no todos los animales están bajo las mismas condiciones. En este trabajo se pudieron analizar los comportamientos de diferentes estados de la República Mexicana. Puebla y Veracruz fueron los que más muestras remitieron al laboratorio en el periodo de respectivamente). En cuanto a los resultados obtenidos de la MIC₉₀ (16 µg/mL para Puebla y 128 µg/mL en Veracruz), indican graves problemas de resistencia en ambos estados. En los aislamientos de estados pertenecientes a la zona centro del país, se obtuvieron resultados para la MIC₉₀ de 4 µg/mL para el Estado de México, 8 µg/mL para la Ciudad de México y 16 µg/mL para Querétaro, que también provenían de animales enfermos y de producciones intensivas, considerados como resistentes, sin embargo, es menor a los estados más productores de cerdo. Además, la MIC₅₀ obtenida en los aislamientos ya se encuentra en el punto de corte (2 µg/mL) esta es una de las razones por la cual la preocupación de la aparición de resistencia en medicina veterinaria y sobre todo en animales productores de alimento va en aumento.

La administración de colistina en cerdos es más común en alimentos y agua, por lo que animales enfermos y sanos son expuestos al antibiótico, (5) lo que aumenta el riesgo de seleccionar bacterias resistentes. Para este trabajo el comportamiento de la resistencia no puede relacionarse directamente a una previa exposición a la colistina dado que no se cuenta con información del manejo en el que se encontraban los animales de los cuales provenían las muestras. Para el monitoreo a futuro de la resistencia, es necesario que tanto las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana como la dosificación en cerdos de los antimicrobianos sean estandarizados, para que bajo estas condiciones permita la comparación de eficacia terapéutica y frecuencia de resistencia entre estudios.

Los resultados obtenidos en este trabajo fueron determinados a través de la MIC, mediante la prueba de microdilución en caldo, para conocer la frecuencia del gen *mcr* y sus variantes que han estado presentes en la producción porcina de México es necesario realizar pruebas moleculares. Ya que, Garza en 2018 reporta la detección del gen *mcr-1* proveniente de una

E. coli aislada en 2015 de un cerdo sano de dos meses de edad, pudiendo haber sido expuesto a colistina en las primeras semanas de vida. (53)

La aparición de la RAM no solo es responsabilidad de la salud animal, es consecuencia del mal uso que han dado a los antibióticos en medicina humana, como lo es su uso en el tratamiento de enfermedades virales, las aguas residuales y su uso para el riego de productos agrícolas. Estas prácticas de igual forma representan factores de riesgo para la diseminación de microorganismos resistentes.

CONCLUSIÓN

De un total de 316 aislamientos analizados de *E. coli* provenientes de cerdos enfermos, el porcentaje de resistencia a la colistina fue de 43 % en el período de 2003 a 2018. Veracruz y Puebla fueron los Estados con el mayor número de muestras analizadas. La MIC50 está comprometida ya que cuatro de los seis períodos están por arriba del punto de corte y la MIC90 con valores altos de resistencia en todos los períodos. Al realizar el análisis para conocer el comportamiento de esta resistencia a lo largo de la década, se observó diferencia estadísticamente significativa ($p=0.003$). La falta de datos clínicos específicos del uso de colistina en cerdos a partir de los cuales se obtuvieron las muestras no permitió conocer el grado de exposición previa a este antibiótico y su relación con el nivel de resistencia obtenido. Por lo tanto, es necesario establecer monitoreos de la resistencia bacteriana con el fin de evaluar la viabilidad del uso de colistina en las producciones porcinas. Así mismo, es de suma importancia buscar alternativas terapéuticas competitivas para colistina en la industria porcina, para preservar la efectividad de este antibiótico, crucial en medicina humana.

Debido al reciente interés en la colistina y la creciente preocupación de la resistencia antimicrobiana, existe cada vez más información sobre la relación del desarrollo de resistencia con los tratamientos administrados en granjas comerciales, sin embargo, deberán ser evaluados de una forma que los valores sean representativos para la evaluación de las opciones de tratamiento y medidas a tomar.

Será vital para la lucha contra la resistencia a los antimicrobianos, hacer diagnósticos de laboratorio para conocer la incidencia de las enfermedades que afectan al ganado y los niveles de resistencia a los antimicrobianos. Esta vigilancia permitirá tomar medidas correctivas, ya que la principal causa de la resistencia es el uso incorrecto de los antimicrobianos por prescripción innecesaria y fallas en la dosificación.

REFERENCIAS

1. Consejo Mexicano de la Carne. Compendio Estadístico 2018 [Internet]. 2019. Disponible en: <https://comecarne.org/estadisticas>
2. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Carne en Canal de Porcino [Internet]. Disponible en: http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecAvanceProd.jsp
3. FAO. World agriculture: towards 2015 / 2030. 2015;97.
4. Magallón, Emilio; García, Alberto; Bautista, Roberto; Alonso, Boris; Cano, José Ignacio; Prieto, Patricia; Magallón P. Manejo y gestión de maternidades porcinas II. La lactación. Editorial Servet; 2015. 200 p.
5. Colibacilosis (*E. coli* diarrhea) | Iowa State University [Internet]. [Consultado 2020 Abril 4]. Disponible en: <https://vetmed.iastate.edu/vdpam/FSVD/swine/index-diseases/colibacilosis>
6. Prieto Suárez, Cinta; Martínez Lobo, Francisco Javier; Segalés i Coma, Joaquim; Carvajal Urueña AM. Enfermedades infecciosas del ganado porcino. 2017. 264 p
7. Bouzari S, Jafari A, Aslani MM. *Escherichia coli*: A brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. *Iran J Microbiol.* 2012;4(3):102–17.
8. Natarro, James; Kaper J. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(1):142–201.
9. Estrada-Garcia T, Hodges K, Hecht GA, Tarr PI. *Escherichia coli*. In: Foodborne Infections and Intoxications. Elsevier Inc.; 2013. p. 129–64.
10. Desmarchelier P, Fegan N. Pathogens in Milk: *Escherichia coli*. In: Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition. Elsevier Inc.; 2011. p. 60–6.
11. OMS | ¿Qué es la resistencia a los antimicrobianos? [Internet]. [Consultado 2020 Abril 4]
12.]. Disponible en: <https://www.who.int/features/qa/75/es/>
13. OMS | Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. [Consultado 2020 Abril 4]. Disponible en: https://www.who.int/topics/antimicrobial_resistance/es/
14. AMR_ES: OIE - World Organisation for Animal Health [Internet]. [Consultado 2020 Abril 4]. Disponible en: <https://www.oie.int/es/para-los-periodistas/amr-es/>

15. OIE. Criterios usados para la clasificación de los agentes antimicrobianos LISTA DE AGENTES ANTIMICROBIANOS. 2015;33(0):1–9.
16. Errecalde O.J (2004) USO DE ANTIMICROBIANOS EN ANIMALES DE CONSUMO, incidencia del desarrollo de resistencias en la salud pública [En línea] Disponible en: <http://www.fao.org/3/y5468s/y5468s00.htm#Contents>. [Último acceso 12 Feb. 2019].
17. Hao H, Sander P, Iqbal Z, Wang Y, Cheng G, Yuan Z. The risk of some veterinary antimicrobial agents on public health associated with antimicrobial resistance and their molecular basis. Vol. 7, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2016. p. 1626.
18. Burow E, Rostalski A, Harlizius J, Gangl A, Simoneit C, Grobbel M, et al. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* from pigs from birth to slaughter and its association with antibiotic treatment. *Prev Vet Med* [Internet]. 2019;165(September 2018):52–62. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.02.008>
19. Crofts TS, Gasparrini AJ, Dantas G. Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. Vol. 15, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group; 2017. p. 422–34.
20. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2016 Feb 1 [Consultado 2019 Feb 25];16(2):161–8. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309915004247>
21. Gao Y, Lu C, Shen D, Liu J, Ma Z, Yang B, et al. Elimination of the risks of colistin resistance gene (mcr-1) in livestock manure during composting ☆. *Environ Int* [Internet]. 2019;126(February):61–8. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.02.015>
22. Medina DJ, Paciel D, Noceti O, Rieppi G. Actualización acerca de colistina (polimixina E): aspectos clínicos, PK/PD y equivalencias. 2017;33(3):195–206.
23. Huang X, Yu L, Chen X, Zhi C, Yao X, Liu Y, et al. High prevalence of colistin resistance and mcr-1 gene in *Escherichia coli* isolated from food animals in China. *Front Microbiol*. 2017;8(APR):1–5.

24. Rhouma M, Beaudry F, Thériault W, Letellier A, Allen HK. Colistin in Pig Production: Chemistry , Mechanism of Antibacterial Action , Microbial Resistance Emergence , and One Health Perspectives. 2016;7 (November):1–22
25. Yu Z, Qin W, Lin J, Fang S, Qiu J. Antibacterial mechanisms of polymyxin and bacterial resistance. *Biomed Res Int*. 2015;2015(May).
26. Maalej SM, Meziou MR, Rhimi FM, Hammami A. Comparison of disc diffusion, Etest and agar dilution for susceptibility testing of colistin against Enterobacteriaceae. *Lett Appl Microbiol*. 2011;53(5):546–51.
27. Oteo J, Calbo E, Rodríguez-Baño J, Oliver A, Hornero A, Ruiz-Garbajosa P, et al. La amenaza de las enterobacterias productoras de carbapenemasas ~ documento de posicionamiento de los grupos de estudio en España : GEIH y GEMARA de la SEIMC. *Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]*. 2014 Dec 1 [Consultado 2019 Feb 20];32(10):666–70. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213005X14000809>
28. Rhouma M, Beaudry F, Letellier A. Resistance to colistin: what is the fate for this antibiotic in pig production? *Int J Antimicrob Agents [Internet]*. 2016;48(2):119–26. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.04.008>
29. Rhouma M, Beaudry F, Thériault W, Bergeron N, Laurent-Lewandowski S, Fairbrother JM, et al. Gastric stability and oral bioavailability of colistin sulfate in pigs challenged or not with *Escherichia coli* O149: F4 (K88). *Res Vet Sci [Internet]*. 2015;102:173–81. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.08.005>
30. Poirel L, Aurélie J, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes Laurent Poirel,a,b,c, Aurélie Jayola,b,c and Patrice Nordmann. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30(2):557–96.
31. Kempf I, Jouy E, Chauvin C. Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. *Int J Antimicrob Agents [Internet]*. 2016;48(6):598–606. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.09.016>
32. Kempf I, Fleury MA, Drider D, Bruneau M, Sanders P, Chauvin C, et al. What do we know about resistance to colistin in Enterobacteriaceae in avian and pig production

- in Europe? Int J Antimicrob Agents [Internet]. 2013;42(5):379–83. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.06.012>
33. Matuschek E, Åhman J, Webster C, Kahlmeter G. Antimicrobial susceptibility testing of colistin – evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. Clin Microbiol Infect [Internet]. 2018;24(8):865–70. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.11.020>
34. Mosquito S, Ruiz J, Ochoa TJ. MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA EN *Escherichia coli* ASOCIADAS A DIARREA *Escherichia coli*- ASSOCIATED DIARRHEA. 2011;28(4):9–11.
35. Nicodemo AC, Araujo MRE, Ruiz AS, Gales AC. In vitro susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates: Comparison of disc diffusion, Etest and agar dilution methods. J Antimicrob Chemother. 2004;53(4):604–8.
36. Rapoport M, Faccone D, Pasteran F, Ceriana P, Albornoz E, Petroni A, et al. First Description of mcr-1 -Mediated Colistin Resistance in Human Infections Caused by *Escherichia coli* in Latin America. 2016;60(7):4412–3.
37. Rhouma M, Fairbrother JM, Beaudry F, Letellier A. Post weaning diarrhea in pigs : risk factors and non - colistin - based control strategies. Acta Vet Scand. 2017;1–19.
38. ISO 20776-1:2019 Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices — Part 1: Broth microdilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases
39. Habrun B, Dragica S, Kompes G, Benić M. Antimicrobial susceptibility of enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from weaned pigs in Croatia. Acta Vet Brno. 2011;61(5–6):585–90.
40. García V, García-Meniño I, Mora A, Flament-Simon SC, Díaz-Jiménez D, Blanco JE, et al. Co-occurrence of mcr-1, mcr-4 and mcr-5 genes in multidrug-resistant ST10 Enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Spain (2006-2017). Int J Antimicrob Agents. 2018;52(1):104–8.

41. Enne VI, Cassar C, Sprigings K, Woodward MJ, Bennett PM. RESEARCH LETTER
A high prevalence of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from pigs and
a low prevalence of antimicrobial resistant *E. coli* from cattle and sheep in Great
Britain at slaughter. 2007;
42. Delannoy S, Devendec L Le, Jouy E, Fach P, Drider D, Kempf I. Characterization of
colistin-resistant *Escherichia coli* isolated from diseased pigs in France. *Front
Microbiol.* 2017;8(NOV):1–12.
43. Food Safety Authority E. SCIENTIFIC REPORT OF EFSA AND ECDC EU
Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from
humans, animals and food in 2013 European Food Safety Authority European Centre
for Disease Prevention and Control. *EFSA J* [Internet]. 2013;1313(17810).
Disponibile en: www.efsa.europa.eu/efsajournal
44. Food E, Authority S. The European Union Summary Report on Antimicrobial
Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in
2017/2018. *EFSA J.* 2020;18(3).
45. Communications- S. SHORT COMMUNICATIONS- in enteric porcine *Escherichia
coli* strains in Spain. 2000;(1997):703–6.
46. Zhang X, Zhang B, Guo Y, Wang J, Zhao P, Liu J, et al. Colistin resistance prevalence
in *Escherichia coli* from domestic animals in intensive breeding farms of Jiangsu
Province. *Int J Food Microbiol.* 2019;291(November 2018):87–90.
47. Lu L, Dai L, Wang Y, Wu C, Chen X, Li L, et al. Characterization of antimicrobial
resistance and integrons among *Escherichia coli* isolated from animal farms in
Eastern China. *Acta Trop.* 2010;113(1):20–5.
48. Harada K, Asai T, Kojima A, Oda C, Ishihara K, Takahashi T. Antimicrobial
susceptibility of pathogenic *Escherichia coli* isolated from sick cattle and pigs in
Japan. *J Vet Med Sci.* 2005;67(10):999–1003.
49. Callens B, Boyen F, Catry B, Ingenbleek A, Butaye P, Haesebrouck F, et al. Reply to
letter to the Editor by Moore and Elborn (2012) concerning the manuscript “
Prophylactic and metaphylactic antimicrobial use in Belgian fattening pig herds” by
B. Callens et al. (2012). *Prev Vet Med.* 2012;107(3–4):288–90.

50. World Organisation for Animal Health. OIE Annual report on antimicrobial agents intended for use in animals. Second Report. París, Francia; 2017.
51. World Organisation for Animal Health. OIE Annual report on antimicrobial agents intended for use in animals. 2016. OIE World Organ Anim Heal. 2016;
52. World Organisation for Animal Health. OIE Annual report on antimicrobial agents intended for use in animals. Third Report. 2018.
53. Miguela-Villoldo P, Hernández M, Moreno MA, Rodríguez-Lázaro D, Quesada A, Domínguez L, et al. National colistin sales versus colistin resistance in Spanish pig production. Res Vet Sci [Internet]. 2019;123(January):141–3. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.01.010>
54. Garza-Ramos U, Tamayo-Legorreta E, Arellano-Quintanilla DM, Rodriguez-Medina N, Silva-Sanchez J, Catalan-Najera J, et al. Draft genome sequence of a multidrug- and colistin-resistant mcr-1- producing *Escherichia coli* isolate from a swine farm in Mexico. Genome Announc. 2018;6(10):1–2.