



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA FACULTAD DE VETERINARIA**

**TESIS DE DOCTORADO**

**Resistencia a antimicrobianos de importancia crítica en  
enterobacterias aisladas de terneros, aves y cerdos en producción  
de Uruguay, y pollitos importados de Brasil**

**"por"**

**Dra. Nadia COPPOLA**

**Tutor: Dr. Rafael VIGNOLI  
Co- tutor: Dr. Pablo ZUNINO  
Co- tutora: Dra. Inés BADO**

**NOMBRE DEL PROGRAMA DE POSGRADO**

**Doctorado en Salud Animal**

**Facultad de Veterinaria**

**2024**







Centro de Posgrados y Educación Permanente  
Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República

ACTA DEFENSA DE TESIS DE DOCTORADO

ORIENTACIÓN: Doctorado en Salud Animal

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: 26/03/2025

TRIBUNAL: Edgardo Gianecchini (presidente), Gustavo Varela y José Di Conza.

CI	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
4781049-D	NADIA COPPOLA	555	12

NOTA: La calificación mínima para aprobar la defensa es Buena (8)

Tesis robusta, con resultados consistentes con estudios previos en la región. Estos puntos abren puertas que van a influir en las políticas de salud animal en el contexto del manejo y prevención de la resistencia bacteriana. El texto de la tesis resultó fácil de leer y tratar el tema de forma detallada. Respondió con solvencia los preguntas del tribunal

TRIBUNAL

FIRMA

EDGARDO GIANECCHINI (Presidente)

GUSTAVO VARELA

José Di Conza



# AGRADECIMIENTOS



## AGRADECIMIENTOS

Al finalizar este camino, que ha sido tanto un desafío como un aprendizaje continuo, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a quienes han sido parte fundamental en la realización de esta tesis.

En primer lugar, a mi tutor, Rafael Vignoli, por su invaluable guía, paciencia y constante motivación. Su experiencia y compromiso fueron esenciales para alcanzar los objetivos de este proyecto, y su apoyo en los momentos más difíciles me permitió seguir adelante.

A mis cotutores, Pablo Zunino e Inés Bado, les agradezco profundamente por su acompañamiento y por enriquecer este trabajo con sus ideas, dedicación y aportes científicos, que fueron clave para darle forma a esta investigación.

A mis compañeros de laboratorio, Bibiana Freire, Ines Bado, Nicolás Cordeiro, Romina Papa, Federica Ferreira, Virginia García, Tamara Iglesias, Cecilia D'Álora, Ana Caetano, Leticia Caiata, Lucía Araujo, Agustín Inchausti y muchas otras personas, gracias por su ayuda, conocimiento y camaradería. Compartir este proceso con ustedes no solo hizo posible este proyecto, sino que lo convirtió en una experiencia gratificante.

A mis compañeros de la Unidad Académica de Salud Pública Veterinaria, a Bibiana Freire y Cecilia Luce por su constante apoyo, a Gustavo Castro y Valérie Cayssials por su disposición y ayuda, y a mis tesisistas Cecilia Fenocchi y Leonardo López por su respaldo y aliento continuo.

A mis amigas y amigos (Isa, Sofi, Vale, Ro, Fede, Santy y muchos más) quienes con su compañía y palabras de aliento me recordaron que no estaba sola en este camino. Gracias por entender mis ausencias y por ser siempre un pilar de apoyo.

Finalmente, a mi familia, los que están y los que no, que han sido mi mayor motor. Su amor incondicional, confianza y fortaleza me acompañaron en cada desafío, y a ellos les dedico este logro con todo mi corazón.

A todos los que de alguna manera contribuyeron a que este proyecto se materializara, mi más profundo agradecimiento. Este trabajo es el resultado de un esfuerzo colectivo que siempre valoraré.



# TABLA DE CONTENIDOS, LISTAS DE TABLAS Y FIGURAS



## TABLA DE CONTENIDOS

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	5
AGRADECIMIENTOS.....	7
TABLA DE CONTENIDOS, LISTAS DE TABLAS Y FIGURAS.....	9
TABLA DE CONTENIDOS.....	11
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	15
TABLAS.....	15
FIGURAS.....	15
ABREVIATURAS.....	17
ABREVIATURAS.....	19
RESUMEN .....	21
RESUMEN .....	23
SUMMARY .....	25
SUMMARY .....	27
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	30
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	32
1. Sistemas de producción animal en Uruguay.....	32
1.A Generalidades .....	32
1.B Cría de terneros en tambos de Uruguay .....	34
1.C Sistema productivo de cerdos (suinocultura) .....	34
1.D Sistema productivo avícola .....	34
2. “Una salud” .....	36
3. Resistencia a antimicrobianos .....	37
4. Antimicrobianos de importancia crítica con acción sobre enterobacterias.....	45
4.A. $\beta$ -lactámicos .....	45
4.A.1.Generalidades .....	45
4.A.2. Clasificación y estructura química.....	46
4.A.3. Uso de antibióticos $\beta$ -lactámicos en producción animal .....	48
4.B. Quinolonas .....	50
4.B.1.Generalidades .....	50
4.B.2. Clasificación y estructura química.....	50
4.B.3. Mecanismo de acción de las quinolonas.....	51
4.B.4. Uso de las quinolonas en producción animal .....	51
4.C. Polimixinas .....	52
4.C.1.Generalidades .....	52

4.C.2. Clasificación y estructura química.....	52
4.C.3 Mecanismo de acción de las polimixinas .....	53
4.C.4. Uso de polimixinas en producción animal .....	53
5. Mecanismo de resistencia bacteriana .....	54
5.A. Generalidades .....	54
5.B. Genética molecular de la resistencia antimicrobiana .....	54
5.B.1. Elementos de transferencia horizontal en <i>Enterobacteriaceae</i> .....	55
5.B.2. Diseminación de la Resistencia .....	56
5.B.3 Formas de intercambio genético entre bacterias .....	56
5.C. Mecanismo de resistencia a $\beta$ -lactámicos .....	57
5.C.1. Resistencia a los $\beta$ -lactámicos por inactivación enzimática.....	57
5.C.2. Principal grupo de BLEE de importancia en salud.....	59
5.C.3. <i>Escherichia coli</i> productoras de BLEE en animal y alimentario .....	60
5.D. Mecanismos de resistencia a quinolonas.....	61
5.D.1. Resistencia plasmídica a quinolonas (PMQR) .....	61
5.D.2. Distribución del gen <i>qnr</i> .....	63
5.D.3. Resistencia transferible a quinolonas circulando en humanos y animales en Uruguay.....	64
5.E. Mecanismo de resistencia a la polimixina.....	64
5.E.1. Mecanismo plasmídico de resistencia a polimixina .....	64
5.E.2. Circulación de genes <i>mcr</i> .....	65
CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS .....	66
CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA .....	68
HIPÓTESIS .....	69
OBJETIVOS .....	70
OBJETIVOS .....	72
1. Objetivos Generales .....	72
2. Objetivos Específicos .....	72
ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN .....	74
MATERIALES Y MÉTODOS.....	74
ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN .....	76
1. Actividades de campo .....	76
2. Actividades de laboratorio .....	76
MATERIALES Y MÉTODOS.....	77
1. Cepas de <i>E. coli</i> en terneros de leche.....	77
2. Elección de los establecimientos de producción de cerdos, muestreo .....	77
3. Elección de granjas avícolas, muestreo.....	77
4. Muestreo de fondos de cajas de pollitos de un día importados de Brasil .....	78
5. Obtención de aislamientos resistentes a antimicrobianos .....	78

6. Identificación de los aislamientos y generación de bancos maestros .....	79
7. Estudios de susceptibilidad antimicrobiana.....	79
8. Mecanismos de resistencia transferibles y ensayos de conjugación .....	81
8.A-Extracción de ADN .....	81
8.B- Preparación de las reacciones de amplificación .....	81
8.C- Visualización de productos de PCR .....	82
8.D- Secuenciación de amplicones.....	82
8.E- Movilidad de los mecanismos de resistencia.....	83
8.F- Grupos de incompatibilidad plasmídica .....	83
9. Estudio de la clonalidad: pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) .....	84
10. Multi-locus sequence typing .....	84
11. Secuenciación de genoma completo (WGS) ( <i>E. coli</i> aisladas de pollitos BB) .....	84
12. Análisis Estadístico .....	86
RESULTADOS .....	87
RESULTADOS .....	89
SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE URUGUAY .....	89
1. Mapa de los diferentes establecimientos/granjas muestreadas según la especie animal .....	89
2. Resistencia a antibióticos críticos en terneros de tambo, cerdos y aves en producción de Uruguay .....	90
2.A Resistencia a antibióticos críticos por establecimiento y especie animal estudiada.....	90
2.B Animales con aislamientos de <i>E. coli</i> resistentes a ciprofloxacina, ceftriaxona y/o colistina por especie animal.....	93
2.F.1 Genes transferibles de resistencia a antimicrobianos críticos encontrados en los aislamientos de <i>E. coli</i> obtenidas de terneros.....	104
2.F.2 Genes transferibles de resistencia a antimicrobianos críticos encontrados en los aislamientos de <i>E. coli</i> obtenidas de aves .....	105
2.F.3 Genes transferibles de resistencia a antimicrobianos críticos encontrados en los aislamientos de <i>E. coli</i> obtenidas de cerdos.....	106
2.G Ensayos de transferencia de mecanismos de resistencia .....	107
2.G Estudio de plásmidos y pulsotipos en los aislamientos de <i>E. coli</i> con el gen <i>mcr-1</i> obtenidas de cerdos .....	108
POLLITOS DE UN DIA IMPORTADOS DE BRASIL.....	109
3. Pollitos de un día importados de Brasil.....	109
3.A. Identificación de bacterias resistentes a antimicrobianos de importancia crítica en muestras fecal de pollitos de 1 día de vida .....	109
3.B. Estudio de susceptibilidad antimicrobiana en los aislamientos resistencia a antibióticos críticos obtenidas de pollitos de 1 día de vida.....	110
3.C. Genes de resistencia a antimicrobianos críticos encontrados en los aislamientos obtenidos de pollitos de 1 día de vida.....	110

3.D. Los resultados de los ensayos de conjugación y el PFGE de los aislamientos obtenidos de pollitos de 1 día de vida.....	111
4. Secuenciación del genoma completo (WGS) de aislamientos seleccionados.....	114
4.A. Selección de aislamientos para secuenciación de genoma .....	114
4.B. Análisis de secuenciación del genoma completo (WGS) de aislamientos seleccionados.....	114
4.B.1. Análisis genómico de <i>K. pneumoniae</i> ODC_Kpn3 .....	114
4.B.2. Análisis genómico de <i>E. coli</i> ODC_Ec7.....	114
4.B.3. Análisis genómico de <i>E. cloacae</i> ODC_Eclo3 y ODC_Eclo10 .....	116
4.C. Análisis de los plásmidos del aislamiento ODC_Eclo3.....	116
4.C.1. Análisis de plásmido IncQ.....	116
4.C.2. Análisis del plásmido IncHI2/2A.....	117
4.C.3. Análisis del plásmido IncN2.....	121
DISCUSIÓN.....	124
DISCUSIÓN.....	126
SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE URUGUAY .....	126
1.A Sistema productivo, tipo de establecimiento y especie animal.....	126
1.B Aislamiento de <i>E. coli</i> resistentes a antibióticos críticos por especie animal.....	127
1.C Análisis de susceptibilidad antimicrobiana en los aislamientos de <i>E. coli</i> resistentes a antibióticos críticos por especie animal. ....	129
1.D Genes de resistencia transferibles a antibióticos críticos encontrados .....	133
POLLITOS DE UN DÍA IMPORTADOS DE BRASIL.....	139
2.A Enterobacterias resistentes a antibióticos críticos aisladas de pollitos de un día importados de Brasil .....	139
2.B Genes de resistencia transferibles a antibióticos críticos encontrados y sus plataformas genéticas .....	140
2.C Aislamientos secuenciados de <i>E. cloacae</i> , <i>K. pneumoniae</i> y <i>E. coli</i> .....	143
CONCLUSIONES .....	146
CONCLUSIONES .....	148
PERSPECTIVAS .....	150
PERSPECTIVAS .....	152
BIBLIOGRAFÍA .....	153
BIBLIOGRAFÍA .....	155
ANEXOS .....	174
ANEXOS .....	176
TABLAS DE PRIMERS.....	176
ARTICULOS PUBLICADOS.....	185
POSTERS PRESENTADOS EN CONGRESOS .....	187
PROYECTOS FINANCIADOS EN CONTEXTO DE LA INVESTIGACIÓN .....	188
BECA.....	188

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

### TABLAS

Tabla 1 Antibióticos $\beta$ - lactámicos usados en medicina veterinaria en España.....	49
Tabla 2 Antibióticos $\beta$ - lactámicos usados en medicina veterinaria en Uruguay .....	50
Tabla 3 Antibióticos quinolonas usados en medicina veterinaria en Uruguay .....	52
Tabla 4 Animales estudiados por especie que presentaron aislamientos de E. coli resistentes a al menos un antibiótico crítico testeado .....	93
Tabla 5 Comparación entre las especies animales terneros, aves y cerdos vs aislamientos resistentes a Ciprofloxacina, Ceftriaxona y/o Colistina .....	94
Tabla 6 Resultados por cada antibiótico, mostrando la proporción de aislamientos no susceptibles (%), comparación entre especies estudiadas, el valor del estadístico X <sup>2</sup> y el p-valor .....	96
Tabla 7 Comparación entre la interpretación de resultados de la susceptibilidad a gentamicina por la CLSI 2021 vs CLSI 2024 por aislamiento y por especie estudiada. ....	99
Tabla 8 Perfiles de no susceptibilidad (resistentes) por especie animal estudiada (terneros, aves y cerdos).....	100
Tabla 9 Perfiles de no susceptibilidad (resistentes) de los aislamientos multidrogo resistentes obtenidos de muestras de terneros, aves y cerdos. ....	102
Tabla 10 Proporciones de genes de resistencia a antibióticos en E. coli aisladas de diferentes especies animales estudiadas.....	104
Tabla 11 Resultados de los estudios por establecimiento de terneros estudiados.....	104
Tabla 12 Resultados de los estudios por establecimiento de aves estudiados .....	105
Tabla 13 Resultados de los estudios por establecimiento de cerdos estudiados.....	106
Tabla 14 Transconjugantes y los mecanismos de resistencia por especie animal.....	107
Tabla 15 Nombre del gen, secuencia de los primers, tamaño del producto de PCR, temperaturas de annealing para cada gen buscado. ....	176
Tabla 16 Nombre del gen, secuencia de los primers, tamaño del producto de PCR, temperaturas de annealing para cada grupo de incompatibilidad plasmídico.....	182
Tabla 17 Nombre del gen, secuencia de los primers, tamaño del producto de PCR, temperaturas de annealing para cada gen para MLST de E. coli. ....	184

### FIGURAS

Figura 1 Mortalidad prevista por RAM en comparación con las causas comunes de muerte en la actualidad.....	39
Figura 2 Consumo de antibióticos en ganado, los diez principales países 2010-2030 (proyección para 2030).....	42
Figura 3 Estimación de distribución del consumo de antibióticos en países de la OCDE. ....	43
Figura 4 Propagación de RAM entre humanos, animales y el medio ambiente por el uso de antimicrobianos. Fuente: Antibiotic Resistance Threats in the United States. 2013.....	45
Figura 5 Estructura química de los betalactámicos. Todos los inhibidores de las betalactamasas que se usan en la práctica (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) tienen estructura betalactámica. El sulbactam y el tazobactam son derivados sulfónicos del ácido penicilánico.....	46
Figura 6 Mapa de la distribución geográfica de los establecimientos muestreados Color amarillo aves, color rojo cerdos y color negro terneros. Link de acceso al mapa:	

<a href="https://www.google.com/maps/d/u/0/edit?mid=1e8MWJcEjCjpbmRgaQi7-Wx3mvpaGRxPp&amp;usp=sharing">https://www.google.com/maps/d/u/0/edit?mid=1e8MWJcEjCjpbmRgaQi7-Wx3mvpaGRxPp&amp;usp=sharing</a> .....	89
Figura 7 Se muestran los cinco establecimientos (tambos) en relación al número de animales (terneros) que presentaron aislamientos resistentes, para cada antibiótico testeado.....	90
Figura 8 Diferencias en el crecimiento de E. coli en ciprofloxacina en terneros entre los dos grupos de establecimientos Grupo 1: E1, E2, E4. vs Grupo 2: E3 y E5. ....	91
Figura 9. Aves por establecimiento con aislamiento de E. coli resistente a al menos uno de los antimicrobianos críticos evaluados. ....	92
Figura 10 Cerdos por establecimiento que presentaron crecimiento de E. coli en presencia de alguno de los antibióticos críticos estudiados. ....	92
Figura 11 Proporción de resistentes a antibióticos testados por especie animal estudiada .....	98
Figura 12 Aislamientos de E. coli multidrogo resistentes (MDR) por especie animal estudiada.....	102
Figura 13 Electroforesis de campo pulsado correspondientes a los aislamientos de E. coli portadoras de mcr-1. ....	109
Figura 14 Electroforesis de gel en campo pulsado (pfge) de 28 pollitos de 1 día (day-old chicks) (odc). “genotipo” se refiere a los genes de resistencia detectados por PCR, susceptibilidad a antibióticos testados y transconjugantes .....	113
Figura 15 Distribución de replicones de plásmidos y genes de resistencia entre las cuatro cepas secuenciadas. las celdas negras indican presencia y las celdas blancas indican ausencia. ....	115
Figura 16 Mapa esquemático de pUR-EC3.1 y comparación con pSRC15 y la región portadora de rmtG presente en el plásmido pec13 (secuencia parcial).. ....	117
Figura 17 Alineación lineal del plásmido pur-ec3.2 con un grupo de plásmidos portadores de mcr-9.1 descritos recientemente (los números de acceso están en paréntesis).....	120
Figura 18 Comparación entre el Tn7337 que contiene el integrón complejo de clase 1 que lleva bla <sub>CTX-M-2</sub> en pur-ec3-2 y contextos genéticos similares descritos para otros plásmidos (los números de acceso están entre paréntesis).....	121
Figura 19 Alineación lineal del plásmido pUR-EC3.3 frente a otros plásmidos IncN2 disponibles en bases de datos públicas (los números de acceso están entre paréntesis).....	122

# ABREVIATURAS



## ABREVIATURAS

**AK** Amikacina

**AMC** Amoxicilina-ácido clavulánico

**ATCC** American-Type Culture Collection

**BGN** Bacilos Gram negativos

**BLEA**  $\beta$ -lactamasas de espectro ampliado

**BLEE**  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido

**BrEt** Bromuro de Etidio

**BOR** ácido borónico

**C3G** Cefalosporinas de tercera generación

**CAZ** Ceftazidime

**CIM** Concentración inhibitoria mínima

**CIP** Ciprofloxacina

**CLSI** Clinical Standard Laboratory Institute

**CN** Gentamicina

**CRO** Ceftriaxona

**ExPEC** *Escherichia coli* extraintestinal

**FAO** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

**GLASS** Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos

**LB** Luria Bertani

**LPS** Lipopolisacárido

**MDR** Multirresistentes a drogas

**MLST** Multilocus sequence typing

**OIE** Organización Mundial de Sanidad Animal

**OMS** Organización mundial de la salud

**OMSA** Organización mundial de la salud animal

**PBP** Penicillin binding protein

**PCR** Polymerase chain reaction

**PFGE** Electroforesis en Campo Pulsado

**PNMA** Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente

**PMQR** Resistencia plasmídica a quinolonas

**PT** Pulsotipo

**RAM** resistencia antimicrobiana

**ST** Secuenciotipo

**TBE** Buffer Tris EDTA Ácido Bórico

# RESUMEN



## RESUMEN

La resistencia antimicrobiana (RAM) es un problema mundial con un impacto creciente en la salud humana, animal y ambiental. El concepto de "Una Salud" considera que la salud de las personas, los animales y el ambiente están interconectadas. La OMS clasifica a los antimicrobianos en tres categorías según su importancia para la medicina humana: de importancia crítica, elevada e importancia, con el objetivo de promover su uso adecuado.

En 2017, la OMS identificó microorganismos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos y para la vigilancia de la RAM. Entre ellos, las enterobacterias resistentes a carbapenemes y/o cefalosporinas de tercera generación se encuentran en la categoría de alta prioridad. Estos microorganismos, presentes en sistemas productivos, pueden incluir cepas patógenas para humanos y animales.

El objetivo de este trabajo fue detectar enterobacterias resistentes a antibióticos de importancia crítica en animales de producción en Uruguay y en embarques de pollitos de un día importados de Brasil. Durante 2016–2019, se muestrearon 132 aves, 100 terneros y 50 cerdos en Uruguay, y entre 2018–2019 se muestrearon 8 embarques de pollitos de un día procedentes de Brasil. Las muestras se cultivaron en agar MacConkey suplementado con ciprofloxacina, ceftriaxona o colistina. Los aislados fueron identificados mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF), y las pruebas de susceptibilidad se realizaron principalmente mediante difusión en disco. Los genes de resistencia se detectaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se confirmaron por secuenciación. Además, en los pollitos se analizó la clonalidad mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), y cuatro cepas multidrogo-resistentes (MDR) se secuenciaron con tecnologías Illumina y/u Oxford Nanopore.

En los sistemas productivos de Uruguay, se detectaron aislamientos de *Escherichia coli* resistentes a antibióticos críticos y de máxima prioridad (ciprofloxacina, ceftriaxona y colistina) en las tres especies estudiadas: terneros, aves y cerdos. En terneros, el 55% presentó resistencia a al menos un antibiótico evaluado, mientras que en aves y cerdos las proporciones alcanzaron el 89 y el 94%, respectivamente. Los genes de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos más frecuentes fueron *qnrB19* (87 animales), seguido de *qnrS1* (23 animales) y *qnrE1* (6 pollos y 2 terneros). Asimismo,

se identificaron 8 genes de  $\beta$ -lactamasas diferentes, entre los cuales *bla*<sub>CTX-M-8</sub> y *bla*<sub>CMY-2</sub> fueron los más comunes, presentes en 23 y 19 animales, respectivamente. Otros genes identificados incluyeron *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub>, *bla*<sub>CTX-M-14</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>SHV2a</sub> y *bla*<sub>CTX-M-55</sub>. El gen *mcr-1*, asociado a resistencia a colistina, se detectó en 7 cerdos de una granja y en un ave, frecuentemente junto a genes como *bla*<sub>CMY-2</sub> y *bla*<sub>SHV-12</sub>.

En los pollitos importados de Brasil, se aislaron 28 enterobacterias MDR, incluyendo 14 *Escherichia coli*, 11 *Enterobacter cloacae* y 3 *Klebsiella pneumoniae*. Las resistencias a oximiinocefalosporinas se asociaron con los genes *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-8</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>CTX-M-55</sub> y *bla*<sub>CMY-2</sub>. La resistencia a quinolonas mediadas por plásmidos estuvo relacionada con *qnrB19*, *qnrE1* y *qnrB2*, mientras que la resistencia a colistina, aminoglucósidos y fosfomicina se vinculó a *mcr-9.1*, *rmtG* y *fosA*, respectivamente. La secuenciación genómica de *E. cloacae* ODC\_Eclo3 reveló plásmidos de resistencia como *IncQ/rmtG* (pUR-EC3.1), *IncHI2A/mcr-9.1/bla*<sub>CTX-M-2</sub> (pUR-EC3.2) e *IncN2/qnrB19/aacC3/aph(30)-Ib* (pUR-EC3.3).

Este es el primer estudio que investiga la resistencia transferible a antibióticos de importancia crítica en tres sistemas de producción animal en Uruguay. Además, se demostró que los pollitos de un día importados de Brasil actúan como "caballos de Troya" para la propagación oculta de bacterias MDR hacia las granjas uruguayas. Estos hallazgos son un tema crítico desde la perspectiva de "Una Salud".

# SUMMARY



## SUMMARY

Antimicrobial resistance (AMR) is a global issue with an increasing impact on human, animal, and environmental health. The concept of "One Health" emphasizes the interconnectedness of human, animal, and environmental health. The WHO classifies antimicrobials into three categories based on their importance for human medicine: critically important, highly important, and important, aiming to promote their appropriate use.

In 2017, the WHO identified priority microorganisms for research and development of new antibiotics and AMR surveillance. Among them, carbapenem-resistant and/or third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae are considered high-priority pathogens. These microorganisms, often present in production systems, can include pathogenic strains for both humans and animals.

The objective of this study was to detect Enterobacteriaceae resistant to critically important antibiotics in production animals in Uruguay and in shipments of day-old chicks imported from Brazil. From 2016 to 2019, 132 birds, 100 calves, and 50 pigs were sampled in Uruguay, while eight shipments of day-old chicks were sampled between 2018 and 2019. Samples were cultured on MacConkey agar supplemented with ciprofloxacin, ceftriaxone, or colistin. Isolates were identified using mass spectrometry (MALDI-TOF), and susceptibility testing was mainly performed via disk diffusion. Resistance genes were detected by polymerase chain reaction (PCR) and confirmed by sequencing. In addition, clonal relationships among chick isolates were analyzed using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and four multidrug-resistant (MDR) strains were sequenced using Illumina and/or Oxford Nanopore technologies.

In Uruguay's production systems, *Escherichia coli* resistant to critical antibiotics (ciprofloxacin, ceftriaxone, and colistin) were detected in all three species studied: calves, birds, and pigs. Resistance to at least one tested antibiotic was found in 55% of calves, 89% of birds, and 94% of pigs. The most frequent plasmid-mediated quinolone resistance genes were *qnrB19* (87 animals), followed by *qnrS1* (23 animals) and *qnrE1* (6 birds and 2 calves). Additionally, eight  $\beta$ -lactamase genes were identified, with *bla<sub>CTX-M-8</sub>* and *bla<sub>CMY-2</sub>* being the most common, detected in 23 and 19 animals,

respectively. Other detected genes included *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub>, *bla*<sub>CTX-M-14</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>SHV2a</sub>, and *bla*<sub>CTX-M-55</sub>. The *mcr-1* gene, associated with colistin resistance, was found in seven pigs from one farm and in one bird, often alongside genes such as *bla*<sub>CMY-2</sub> and *bla*<sub>SHV-12</sub>.

In day-old chicks imported from Brazil, 28 MDR Enterobacteriaceae were isolated, including 14 *Escherichia coli*, 11 *Enterobacter cloacae*, and 3 *Klebsiella pneumoniae*. Resistance to oxyimino-cephalosporins was associated with *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-8</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>CTX-M-55</sub>, and *bla*<sub>CMY-2</sub> genes. Plasmid-mediated quinolone resistance was linked to *qnrB19*, *qnrE1*, and *qnrB2*, while colistin, aminoglycoside, and fosfomicin resistance were related to *mcr-9.1*, *rmtG*, and *fosA* genes, respectively. Whole-genome sequencing of *E. cloacae* ODC\_Eclo3 revealed resistance plasmids such as IncQ/*rmtG* (pUR-EC3.1), IncHI2A/*mcr-9.1/bla*<sub>CTX-M-2</sub> (pUR-EC3.2), and IncN2/*qnrB19/aacC3/aph(30)-Ib* (pUR-EC3.3).

This is the first study investigating transferable resistance to critically important antibiotics in three animal production systems in Uruguay. Additionally, it demonstrated that one day-old chicks imported from Brazil act as “Trojan horses” for the hidden spread of MDR bacteria into Uruguayan farms. These findings represent a critical issue from a “One Health” perspective.



# INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES



## INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

### 1. Sistemas de producción animal en Uruguay

#### 1.A Generalidades

Uruguay es un destacado proveedor mundial de alimentos y productos agrícolas, cuenta con 16,4 millones de hectáreas para uso agropecuario representando más del 90% de su superficie total del territorio nacional (DIEA - MGAP, 2023).

El sector agropecuario representó el 7,4% del Producto Bruto Interno (PBI) de Uruguay en el 2022 (DIEA - MGAP, 2023). El censo más reciente, llevado a cabo en 2011, puso de manifiesto la revolución productiva que experimentó el sector agrícola en nuestro país. Este reveló un cambio significativo en el uso de la tierra para las principales actividades productivas, que pasaron de representar el 14% de las tierras cultivadas en el año 2000 a un 30% en el 2011 (DIEA - MGAP, 2021).

Uruguay se destaca como un país proveedor de alimentos de alta calidad para el mundo. A pesar de tener una población de poco más de tres millones de personas, exportamos alimentos que satisfacen las necesidades de 28 millones de personas en todo el mundo. La estrategia productiva está orientada hacia un ambicioso objetivo: duplicar nuestra producción y tener la capacidad de alimentar a 50 millones de personas. Este enfoque demuestra el compromiso de Uruguay con la producción alimentaria sostenible y su papel vital como proveedor global de alimentos (DIEA - MGAP, 2007; MGAP, 2017).

Los datos productivos de bovinos de carne recabados en 2022 muestran que existen 11,6 millones de bovinos en Uruguay. La producción de carne fue de 1.249 mil toneladas y el consumo de carne vacuna por habitante/ año fue de 45,1 kilos de carcasa (DIEA - MGAP, 2023).

La remisión de leche a plantas industriales fue de 1.734 millones de litros y el total de producción de leche comercial fue de 2.201 millones de litros en el 2022. En Uruguay existen un total de 3.094 establecimientos lecheros de los cuales 2.325 remiten a plantas industriales según datos del MGAP en 2022 (DIEA - MGAP, 2023).

En relación con la producción de carne suina en nuestro país, se registró la existencia de 161 mil cabezas de suinos. Se faenaron 183.913 cabezas entre cerdos gordos y lechones en 2022, lo que equivale a 11.681 toneladas de carne en gancho. El consumo promedio de carne suina por habitante fue de 17,0 kilos por habitante y por año en 2022, con un leve descenso en relación al consumo del año anterior (DIEA - MGAP, 2023). En total se consumieron 60.554 toneladas de carne suina, evidenciando que la producción de carne no alcanza para satisfacer la demanda interna, teniendo que importar el 16% de la carne suina que se consume en Uruguay de países vecinos (DIEA - MGAP, 2023).

Para el caso de la producción de huevos en 2022 se registró una postura de 2.290.000 de cajas de 30 docenas de huevos, con un consumo total de 2.352.733 cajas de 30 docenas de huevos, con un promedio de consumo de 238 huevos por habitante por año. Como se observa en los datos presentados, el país consume más huevos de los que produce debiendo importar casi un 3% los mismos de países vecinos (DIEA - MGAP, 2023). Por otro lado, la edad de inicio de postura fue de 19 semanas, mientras que la de descarte fue de 89 semanas. La producción de huevos por gallina/año fue de 269 huevos para el año 2016 (DIEA - MGAP, 2023).

En cuanto a la producción de pollos parrilleros en 2022, se observó una producción de 74.646 toneladas de carne de pollo. El consumo interno alcanzó las 84.647 toneladas, con un promedio de 24 kg de carne de pollo por persona al año. Esto evidencia que la producción nacional de carne de ave no es suficiente para satisfacer la demanda interna, siendo necesario importar el 12% de la carne de ave que se consume en Uruguay desde países vecinos (DIEA - MGAP, 2023). A nivel del sistema productivo de aves, el promedio de edad en días para faena fue de 53 días y el peso en pie de 3,09 kg en 2022 (DIEA - MGAP, 2023).

A continuación, se describen las características generales de los sistemas productivos o del eslabón del sistema productivo estudiado en este trabajo.

## **1.B Cría de terneros en tambos de Uruguay**

El proceso de cría de terneras/os se refiere al período de tiempo que media entre el nacimiento y el fin de la ingesta de leche por parte del animal. Dicha fase involucra aspectos de alimentación y manejo que pueden diferir entre los establecimientos. En Uruguay, a las terneras hembras se les realiza todo el proceso de cría en el 95% del total de establecimientos lecheros del país. En el caso de los terneros machos los productores realizan la cría, recría o invernada de los mismos en un 62% del total de los establecimientos involucrados, mientras que en el 22% optan por la venta y/o consumo al nacer. Sólo en el 16% de los casos proceden con la cría (DIEA - MGAP, 2007).

## **1.C Sistema productivo de cerdos (suinocultura)**

En Uruguay existen diferentes sistemas de producción de cerdos, dependiendo del objetivo de producción, sistema de alojamiento y sistema de alimentación. Los sistemas de cría se dedican a la producción de lechones destetados, menores a 30 kg, y los de recría, a la producción de cerdos entre 30 y 80 kg (cachorros) cuyo destino es el engorde. Por otro lado, los sistemas de producción de ciclo completo realizan todo el ciclo productivo (reproducción, cría y engorde de los cerdos). El principal producto comercial son cerdos gordos (90-120 kg), pudiendo comercializar todas las categorías. Y, por último, los sistemas de engorde (terminación) cuyo principal objetivo es la obtención de cerdos gordos (90-120 kg) a partir de cachorros o lechones de origen externo al establecimiento (González & Bauza, 2009).

En la encuesta porcina de 2006 se observó un incremento porcentual en la cantidad de criadores comerciales (terminación) (77% del total) y una disminución de los establecimientos de ciclo completo (19 y 4% del total), respecto al Censo de 2000. Según el tipo de alojamiento, tenemos que un 36% de los establecimientos son con confinamiento total o parcial de los animales, un 44% a campo y 20% con combinación de ambos sistemas (Bell et al, 2014; MGAP, 2006).

## **1.D Sistema productivo avícola**

Por otro lado, la avicultura es un rubro de gran relevancia en Uruguay, que involucra dos subsectores, uno dedicado a la producción de pollos parrilleros y otro dedicado a la producción de huevos de consumo (AGEV, 2009; Long et al., 2011).

Si bien los dos subsectores antes mencionados realizan la explotación del mismo animal, algunos eslabones de su cadena productiva difieren en forma importante. Ambos subsectores inician su proceso productivo en las granjas progenitoras, donde se crían las gallinas y gallos (líneas abuelas) con la genética adecuada, que son los padres de los futuros reproductores. Las principales líneas genéticas que se manejan en Uruguay en la producción de huevos son Hisex, Babcock, Hy-Line, H&N, Lohmann y Shaver (reproductoras livianas o semipesadas), mientras que en la producción de pollos parrilleros se trabaja con líneas genéticas como Ross y Cobb (reproductoras pesadas). Estas granjas están concentradas en poco más de 20 empresas en países desarrollados como: Estados Unidos, Francia, Alemania, Gran Bretaña y Holanda. Uruguay se abastece de los huevos fértiles o embrionados o pollitos de un día de vida, de las filiales de dichas empresas transnacionales ubicadas en Argentina y Brasil (AGEV, 2009; Long et al., 2011).

Una segunda etapa de la cadena está constituida por la cría de dichas reproductoras (granjas reproductoras), que son las que producen los huevos fértiles. Posteriormente, los huevos que se obtienen de esta etapa se transfieren a las incubadoras, donde son sometidos a un proceso de incubación hasta que nacen los pollitos de un día (AGEV, 2009; Long et al., 2011).

Los pollitos de un día (destinados a la producción de pollos parrilleros) son distribuidos en las granjas, donde inician el proceso de crecimiento y engorde (granjas de engorde). Ambos procesos, en general, son tercerizados a productores a fañon, quienes reciben los insumos necesarios (entre ellos el alimento balanceado) de la empresa contratante (AGEV, 2009; Long et al., 2011).

En el caso de las pollitas de un día de vida comerciales (destinadas a la producción de huevos de consumo) son distribuidas en las granjas de cría y recría, donde permanecen por un período de 16 semanas hasta que están aptas para pasar a la etapa de postura, la cual se realiza en granjas separadas (granjas de postura) (AGEV, 2009; Long et al., 2011).

Con lo expuesto podemos asegurar que en las últimas dos décadas se han producido cambios significativos en los sistemas de producción animal a nivel mundial y en

nuestro país. Se ha observado un aumento en la productividad y la intensificación en el uso de los recursos, en la producción avícola (gallinas ponedoras y pollo parrilleros), en la cría de cerdos y, fundamentalmente, en la ganadería. Esta intensificación se expone en el ganado lechero, con la aparición de los mega tambos, así como en el ganado destinado a carne, mediante la implementación de los feedlot (DIEA - MGAP, 2023). La intensificación en la producción busca satisfacer la creciente demanda de alimentos, pero plantea desafíos éticos y prácticos. Estos incluyen la eficiencia en el uso de recursos, el impacto ambiental, y el bienestar animal, especialmente debido a las prácticas que limitan el espacio y las interacciones sociales, lo que afecta la salud física y mental de los animales (Fraser, 2006).

## 2. “Una salud”

El enfoque de "Una Salud" es un concepto cuatripartito que integra la salud humana, animal, vegetal y ambiental, reconociendo la interdependencia entre estos ámbitos. Promovido por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA), y el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), este enfoque busca una cooperación interdisciplinaria para enfrentar desafíos de salud global (FAO, 2023; OMS, 2022). Todo lo descrito en el apartado anterior, pone de manifiesto que los sistemas de producción animal deben pensarse desde una perspectiva multisectorial y multidisciplinaria, que garantice dicho enfoque. Lo que es crucial para anticipar, prevenir, detectar y controlar enfermedades que afectan tanto a humanos como a animales (OMS, 2021). Además, el enfoque “Una Salud” aborda la resistencia antimicrobiana (RAM), la seguridad alimentaria y amenazas ambientales, siendo fundamental para alcanzar los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) (FAO, 2023). La RAM ha sido objeto de acciones por parte de organismos internacionales para su prevención y control.

Y en el año 2016, en lo que se calificó como un hecho sin precedentes, los líderes mundiales reunidos en la Asamblea General de las Naciones Unidas (ONU) centraron su atención en cómo detener la propagación de las infecciones causadas por microorganismos RAM. Por vez primera, los Jefes de Estado se comprometieron a adoptar una estrategia de amplio alcance y coordinada para abordar las causas fundamentales de la RAM, desde un enfoque “Una Salud” implicando como “una sola

salud” a la salud humana, la salud animal y al medio ambiente (ONU, 2016). Se comprometieron también a endurecer la regulación de los antimicrobianos, a mejorar el conocimiento y la concienciación, promover las mejores prácticas, además de fomentar enfoques innovadores utilizando alternativas a los antibióticos y nuevas tecnologías para el diagnóstico y las vacunas (Bennett et al., 2017; Rittschof & Robinson, 2013; ONU, 2016).

### **3. Resistencia a antimicrobianos**

Los antimicrobianos se definen como sustancias naturales, semisintéticas o sintéticas que inhiben el crecimiento o provocan la muerte de microorganismos. Se clasifican en antibacterianos, antifúngicos, antivíricos y antiparasitarios. Algunos son producidos de manera natural por microorganismos, mientras que otros son derivados o sintéticos. Se utilizan en salud humana y animal con fines preventivos, terapéuticos o como promotores del crecimiento en animales, aunque este último uso está siendo desestimado debido al desarrollo de resistencia antimicrobiana (OMS, 2017b; Rice, 2008).

Los antimicrobianos representan un avance significativo en el tratamiento de enfermedades infecciosas tanto en humanos como en animales, reduciendo la morbilidad y mortalidad (Rice, 2008).

El uso indiscriminado de antimicrobianos por parte del ser humano ha incrementado su presencia de estos compuestos en las poblaciones humanas, animales y en el medio ambiente. Esto ha generado una presión selectiva sobre las poblaciones microbianas, facilitando la propagación de genes de resistencia a antibióticos. Estos genes pueden transferirse a microorganismos patógenos para humanos y animales a través de elementos genéticos móviles, como plásmidos e integrones. La RAM como ya se mencionó es el fenómeno por el cual un microorganismo deja de ser sensible a un antimicrobiano al que antes lo era. Este fenómeno puede ocurrir de forma natural, como una medida de adaptación al entorno, o de manera adquirida, como se mencionó anteriormente (Madigan, 2004; Mejía et al., 2017).

La RAM se manifiesta como bacterias multiresistentes (MDR), extremadamente resistentes (XDR) y panresistentes (PDR), dificultando el tratamiento de enfermedades infecciosas (Magiorakos et al., 2012). A su vez, la resistencia múltiple se refiere a la capacidad de un microorganismo de ser resistente a diferentes

antibióticos (aunque no sean de la misma clase) debido al uso previo de uno o varios de ellos. En este contexto, significa que la combinación de antibióticos promueve adaptaciones en los microorganismos que los hacen resistentes a varios medicamentos, incluso cuando ya no están en uso (Magiorakos et al., 2012).

Las complicaciones para combatir la RAM, se dan principalmente por el uso continuo, excesivo o indebido de antimicrobianos en los sectores de la salud humana y animal que acelera el desarrollo de resistencia a los antimicrobianos. Es importante la prevención y el control de la transmisión cruzada de microorganismos resistentes a los antimicrobianos en los entornos sanitarios, en particular hospitales y centros de atención de larga duración (Tribunal de cuentas europeo, 2019).

A esta situación se suma la falta de desarrollo de nuevas clases de antibióticos desde la década de 1980 y la eliminación de varios medicamentos del mercado, lo que complica aún más el panorama (OECD, 2018). Además, la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos es un proceso largo, incierto y costoso. En un proyecto reciente financiado por la Empresa Común para la Iniciativa sobre Medicamentos Innovadores (EC IMI) de la Unión Europea, se estimaba que comercializar un nuevo medicamento podría costar 1000 millones de euros (Årdal et al., 2018).

La RAM es por tanto un problema mundial de creciente impacto tanto en salud humana y animal como en la economía (OMS, 2014) y es considerada una amenaza a la esencia misma de la medicina moderna y a la sostenibilidad de una respuesta eficaz de la salud pública mundial ante la amenaza persistente de las enfermedades infecciosas. Es importante resaltar que se prevé una mortalidad de 10.000.000 de personas y un costo de US\$100 trillones debido a infecciones por microorganismos multi-drogo-resistentes (M-MDR), para el 2050, si no se toman medidas inmediatas (Fig. 1) (O'Neill, 2016).

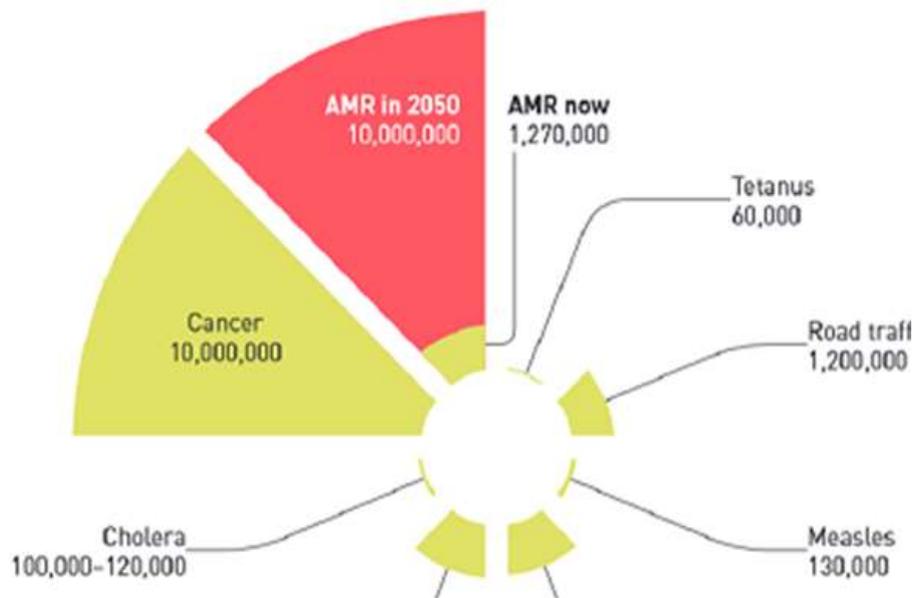


Figura 1 Mortalidad prevista por RAM en comparación con las causas comunes de muerte en la actualidad (adaptado de: Murray et al., 2022; O'Neill, 2016)

En última instancia, la lucha contra la RAM se enfrenta a dos retos principales: 1- garantizar un uso más prudente y eficiente de los antimicrobianos existentes (en particular mediante el aumento de la concienciación, la implementación de mejores prácticas de higiene, la formación, la vigilancia, el seguimiento y la promoción de diagnósticos mejorados en seres humanos, plantas y animales; y 2- descubrir y comercializar nuevos antimicrobianos (a través de la investigación y el desarrollo) (Tribunal de cuentas europeo, 2019).

Como consecuencia de todo esto, en el 2015 durante la Asamblea Mundial de la Salud, la OMS, la FAO y la OIE (actualmente OMSA) presentaron un Plan de acción mundial para luchar contra la RAM, con cinco objetivos estratégicos: 1) mejorar la concienciación y la comprensión con respecto a la resistencia a los antimicrobianos; 2) reforzar los conocimientos a través de la vigilancia y la investigación; 3) reducir la incidencia de las infecciones; 4) utilizar de forma óptima los agentes antimicrobianos; y 5) preparar argumentos económicos a favor de una inversión sostenible que tenga en cuenta las necesidades de todos los países, y aumentar la inversión en nuevos medicamentos, medios de diagnóstico, vacunas y otras intervenciones con el compromiso de todos los países para desarrollar programas en un plazo de 2 años que permita cumplir dichos objetivos (OMS, 2017b).

Por otro lado, desde 2005 la OMS viene actualizando periódicamente una lista de todos los antimicrobianos utilizados actualmente en la medicina humana (y la mayoría de ellos en la medicina veterinaria), agrupándolos en tres categorías en función de su importancia para la medicina humana (de importancia crítica, de importancia elevada o de importancia). El objetivo de la lista es garantizar que todos los antimicrobianos, sobre todo los de importancia crítica, se utilicen de forma prudente en la medicina tanto humana como veterinaria (OMS, 2017a). Además, los antimicrobianos de importancia crítica, se subdividen a su vez, en de máxima prioridad y de gran prioridad. Dentro de esta lista los antimicrobianos de importancia crítica más utilizados como tratamiento para infecciones causadas por bacterias Gram negativas (enterobacterias) se encuentran las polimixinas, las quinolonas, las cefalosporinas (tercera y cuarta generación) (también clasificados como de máxima prioridad), los carbapenémicos y otros penémicos, y los aminoglucósidos (OMS, 2017a).

Y en el 2015 la OIE (actual OMSA) también clasificó todos los antimicrobianos usados en animales destinados a la producción de alimentos, dividiéndolos en antimicrobianos de importancia crítica, de importancia elevada y de importancia. Para ello se seleccionaron los siguientes criterios para determinar el grado de importancia de las diferentes clases de agentes antimicrobianos veterinarios. 1. Tasa de respuesta al cuestionario sobre los agentes antimicrobianos importantes para la medicina veterinaria. Se consideró que este criterio se cumplía cuando la gran mayoría de los que respondieron (más del 50%) señalaron la importancia de una determinada clase de antimicrobianos en su respuesta al cuestionario. 2. Tratamiento de una enfermedad grave de los animales y disponibilidad de agentes antimicrobianos alternativos. Se consideró que este criterio se cumplía cuando se identificaron los compuestos de una clase como esenciales contra determinadas infecciones y se carecía de alternativas terapéuticas suficientes (OIE, 2019). Basándose en estos criterios, se establecieron las siguientes categorías: Agentes antimicrobianos veterinarios de importancia crítica: son aquellos que cumplen A LA VEZ los criterios 1 Y 2. Agentes antimicrobianos veterinarios de importancia elevada: son aquellos que cumplen el criterio 1 o el 2. Agentes antimicrobianos veterinarios de importancia: son aquellos que NO cumplen NI el criterio 1 NI el 2 (OIE, 2019). Donde las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, las quinolonas y los aminoglucósidos se encuentran dentro de los agentes antimicrobianos veterinarios de importancia crítica y las polimixinas entre los agentes antimicrobianos de importancia elevada (OIE, 2019).

Es importante destacar que, entre las recomendaciones de la OIE en su lista de agentes antimicrobianos de uso veterinario, se encuentra la necesidad de priorizar la eliminación progresiva de las clases de antimicrobianos que la OMS clasifica como de importancia crítica y máxima prioridad. Esta prioridad también se extiende a los antimicrobianos utilizados como promotores del crecimiento, que deben ser eliminados de manera gradual por los países (OIE, 2019).

En el 2017 la OMS publicó una lista con la clasificación de los microorganismos a priorizar en la investigación del desarrollo de nuevas opciones terapéuticas. En ésta los microorganismos se clasifican como de prioridad crítica, de prioridad alta y de prioridad media (Kahlmeter & Singh, 2017). Prioridad 1: crítica. *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* resistente a los carbapenémicos, *Enterobacteriaceae* resistentes a los carbapenémicos y/o productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Prioridad 2: elevada. *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina, *Staphylococcus aureus*, resistente a la meticilina con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina, *Helicobacter pylori* resistente a la claritromicina, *Campylobacter* spp. resistente a las fluoroquinolonas, *Salmonella* resistentes a las fluoroquinolonas y *Neisseria gonorrhoeae* resistente a la cefalosporina y resistente a las fluoroquinolonas. Prioridad 3: media. *Streptococcus pneumoniae*, no sensible a la penicilina, *Haemophilus influenzae*, resistente a la ampicilina y *Shigella* spp., resistente a las fluoroquinolonas (Kahlmeter & Singh, 2017; OMS, 2021). En este trabajo se toma como indicadores microbiológicos de la resistencia a las enterobacterias productoras de BLEE.

En 2017, la OMS creó el Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (GLASS) para apoyar la implementación del Plan de Acción Mundial sobre la RAM. Este sistema permite la recolección, análisis e intercambio de datos normalizados y validados sobre la resistencia a los antimicrobianos a nivel global. GLASS proporciona la base empírica necesaria para la toma de decisiones y medidas de sensibilización, incluyendo la vigilancia de bacterias multidrogorresistentes (M-MDR) y la resistencia a antimicrobianos críticos según la OMS, siguiendo una hoja de ruta que especifica los tipos de muestras, patógenos y resistencias a monitorizar (OMS, 2017c).

En este sentido, con el término “Una Salud” las organizaciones internacionales reconocen que es necesario un enfoque integrado para poder contener la RAM como ya se describió anteriormente, que tenga en cuenta la salud humana, la salud animal

y el medio ambiente. Entonces es importante mencionar que el consumo de antimicrobianos por animales destinados a la producción de alimentos es muy superior al consumo humano, ya sea en términos de consumo total, o en términos de dosis en función del peso (Tribunal de cuentas Europeo, 2019).

Existe evidencia de que el uso de antimicrobianos en la producción animal contribuye al desarrollo de RAM en patógenos, lo cual impacta tanto en la salud humana como en la salud animal. Esto ha generado una preocupación mundial sobre la necesidad de garantizar alimentos seguros (Mather et al., 2011).

A pesar de estos estudios, a nivel mundial, en 2010, estimaron que al menos 63.200 toneladas de antibióticos fueron consumidas por animales de la industria ganadera (Van Boeckel et al., 2015). Para 2030, las predicciones son de aumentar esta cifra hasta 105.600 toneladas debido al aumento de producción animal, necesario para satisfacer las demandas del aumento de población (OMS, 2014). China, Estados Unidos y Brasil son actualmente los mayores consumidores, figura 2 izquierda (Gelband et al., 2015).

En Estados Unidos, el 70% del uso de los antibióticos es en animales y el 30% en humanos. Datos similares encontramos en Europa, figura 2 derecha (Van Boeckel et al., 2015). Uno de los principales problemas para evaluar el uso y efecto de los antibióticos en la industria alimentaria es la falta de información fiable. En muchos casos, los contenidos de las formulaciones de piensos en antibióticos son considerados información confidencial de negocios (Silbergeld et al., 2008).

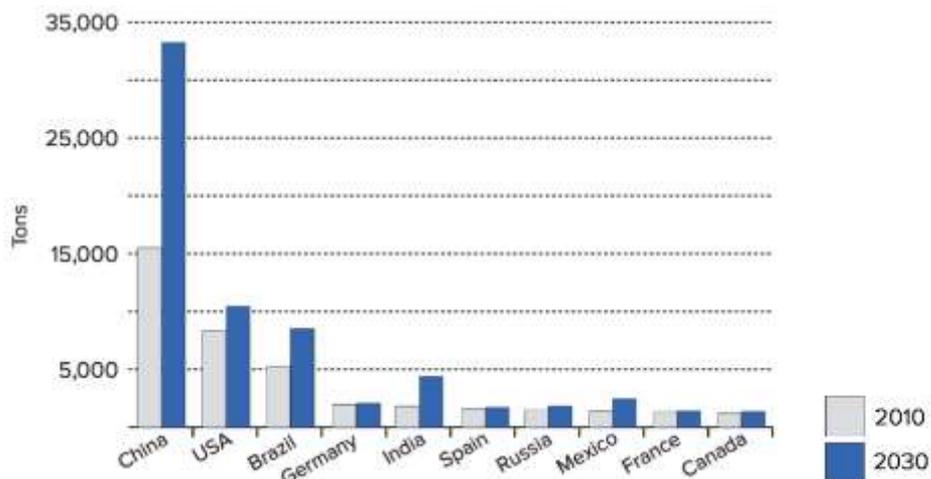


Figura 2 Consumo de antibióticos en ganado, los diez principales países 2010-2030 (proyección para 2030). (Van Boeckel et al., 2015)

Por otro lado, el uso de antibióticos tiene tres objetivos en la producción animal: 1- uso para el tratamiento de infecciones: evitando así la diseminación de la infección a otros miembros del grupo y reduciendo la expulsión vía fecal del patógeno (Lekshmi et al., 2017). 2- Uso como profiláctico: su objetivo es prevenir infecciones mediante un tratamiento grupal de animales. Los antibióticos se incorporan a los piensos en formas de premezclas medicamentosas (sólidas o líquidas) a concentraciones relativamente elevadas; el resultado se denomina pienso medicamentoso (Lekshmi et al., 2017). 3- Y uso como promotor del crecimiento: constituye el uso más controvertido, por ello está prohibido en Europa. En este caso, también se incorpora al pienso en forma de aditivo, pero a concentraciones subterapéuticas. El mecanismo por el cual los antibióticos favorecen el crecimiento (aumento del peso en un 5%) (Gelband et al., 2015) no se conoce con exactitud, se piensa que: 1- Modifican la microbiota intestinal, provocando una disminución de los microorganismos causantes de enfermedades subclínicas crónicas. 2- Dan lugar a un adelgazamiento de la pared de los enterocitos que unido a la regulación de la microbiota intestinal favorece la absorción de nutrientes. 3- Aumento de la producción de vitaminas y otros factores de crecimiento (Lekshmi et al., 2017).

Dentro de la producción animal la utilización de antimicrobianos es desigual: las aves (gallinas) y los cerdos son los animales que más consumen antibióticos, seguidos del ganado bovino, figura 3 (Gelband et al, 2015). En los últimos años, se ha de señalar la acuicultura, como un importante sistema productivo con alto consumo de antimicrobianos (Gelband, 2015).

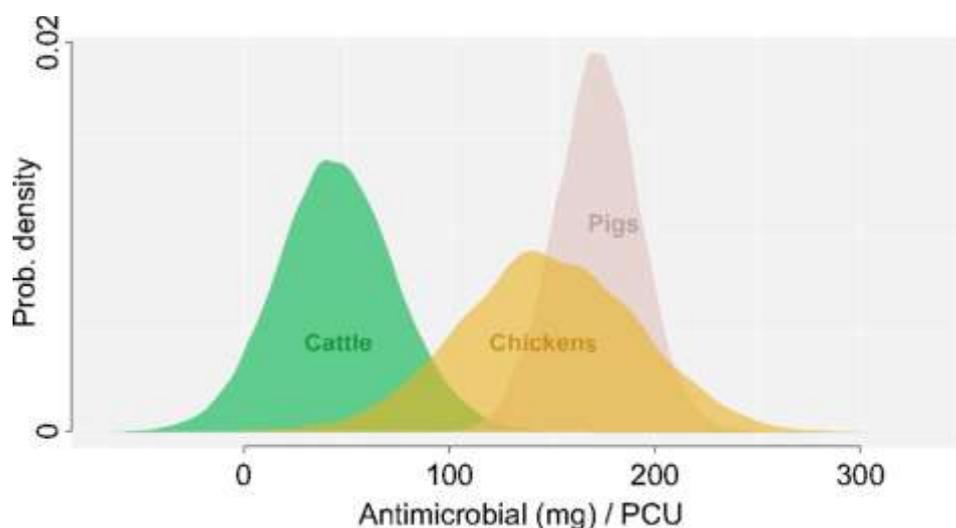
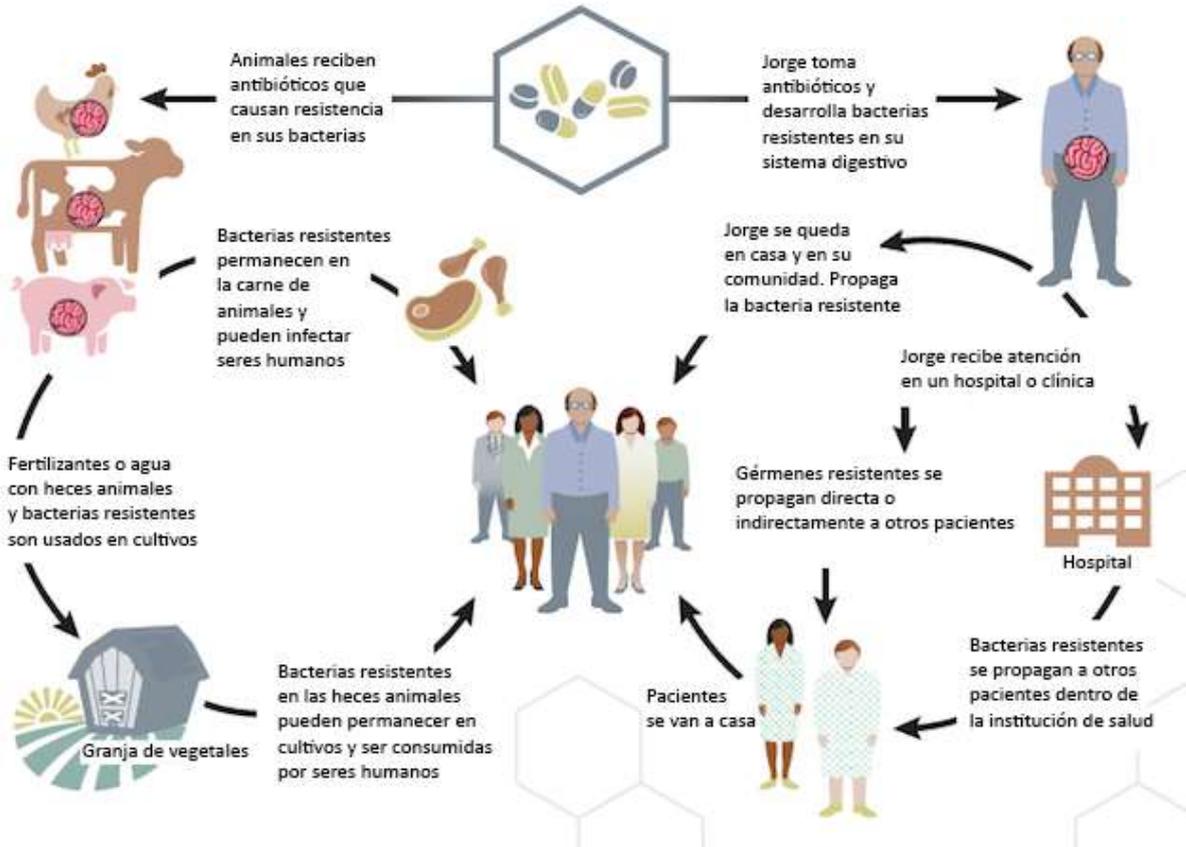


Figura 3 Estimación de distribución del consumo de antibióticos en países de la OCDE (Gelband et al., 2015). Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE): 34 países miembros.

En cuanto a los antibióticos usados en los sistemas de producción animal, de las 27 clases existentes, sólo nueve son usadas exclusivamente en animales (OMS, 2017a). Las tres clases de antibióticos más vendidos para uso animal, se clasifican como antimicrobianos de importancia crítica para la medicina humana (macrólidos, penicilinas y tetraciclinas) por la OMS (OMS, 2017a).

El riesgo más grande para la salud de los consumidores que implica la utilización de antimicrobianos en animales no está dado por los residuos en los alimentos (riesgo químico), sino por el posible desarrollo y/o transmisión de bacterias resistentes desde los animales a través de los alimentos. Alineado con esto, los mercados internacionales han incrementado su preocupación sobre la transmisión de bacterias resistentes (o factores de resistencia) a través de los alimentos importados. Pero además de la posible transmisión de bacterias con genes resistentes de animales a humanos, se ha constatado el proceso inverso denominado humanosis. Ambas vías solo potencian el incremento de la prevalencia de bacterias resistentes. En la figura 4 se muestra un ejemplo de cómo se puede propagar la RAM entre humanos, animales y el ambiente en este caso por el uso de antibióticos (Centers for Disease Control and Prevention., 2013).



Es en este sentido, nuestro país ha tomado medidas para controlar el uso de antimicrobianos a nivel de la medicina veterinaria, apoyándose en varias normas legales. Entre las más importantes encontramos, el Decreto N° 098/2011 que prohíbe el uso de antibióticos como promotores de crecimiento en bovinos y ovinos (MGAP, 2011). Asimismo, la División de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) establece los requisitos y condiciones para el registro de medicamentos veterinarios que contengan antimicrobianos, conforme a las normas recomendadas por organismos de referencia internacionales, según lo dispuesto en la Resolución N° 193/015-DGSG del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP, 2015).

Por otro lado, en los últimos años, la colistina se ha utilizado como un antibiótico de último recurso en medicina humana para tratar infecciones bacterianas Gram-negativas resistentes a múltiples fármacos. Además, estudios recientes han demostrado claramente los vínculos entre el uso de antimicrobianos, incluyendo la colistina, en la producción animal y el desarrollo de resistencia en animales, alimentos y seres humanos (MGAP, 2019) lo que lleva a formular el Decreto N° 141/019, que prohíbe la importación, exportación, fabricación, venta, uso y comercialización de productos veterinarios que contengan "colistina" en su composición, para todas las especies animales, a fin de proteger la salud humana y animal (MGAP, 2019).

A continuación, se describirán los antimicrobianos de importancia crítica estudiados en este trabajo y los mecanismos de resistencia desarrollados por las bacterias frente a estos.

#### **4. Antimicrobianos de importancia crítica con acción sobre enterobacterias.**

##### **4.A. $\beta$ -lactámicos**

###### **4.A.1.Generalidades**

Los antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos, la familia más amplia y comúnmente utilizada en la práctica clínica, son agentes bactericidas que actúan inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana y promoviendo la autólisis bacteriana. La pared celular bacteriana está compuesta por peptidoglicano, siendo más gruesa en las bacterias Gram positivas y

más delgada en las Gram negativas. Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos interfieren en la formación del peptidoglicano al unirse a las transpeptidasas, también conocidas como proteínas de unión a penicilina (PBP), que catalizan la formación de enlaces cruzados entre las cadenas de peptidoglicano. Este componente es crucial para la integridad estructural de la pared bacteriana, proporcionando rigidez y protección contra la presión osmótica y otros factores ambientales. Sin la formación adecuada de esta red de peptidoglicano, las bacterias no pueden mantener su pared celular (Suárez & Gudiol, 2009). Para que los  $\beta$ -lactámicos sean efectivos, es fundamental que las bacterias se encuentren en fase de replicación. Sin embargo, su eficacia puede verse limitada en situaciones clínicas donde la población bacteriana está en un estado estacionario, como en los abscesos (Suárez & Gudiol, 2009).

#### 4.A.2. Clasificación y estructura química

Se subdividen en penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, carbapenemes e inhibidores de betalactamasas (Fig. 5), cada uno con modificaciones estructurales que afectan su espectro y resistencia (Navarro et al., 2010). Los inhibidores de betalactamasas pueden restaurar la actividad de los  $\beta$ -lactámicos bloqueando estas enzimas (Hamon et al., 2021).

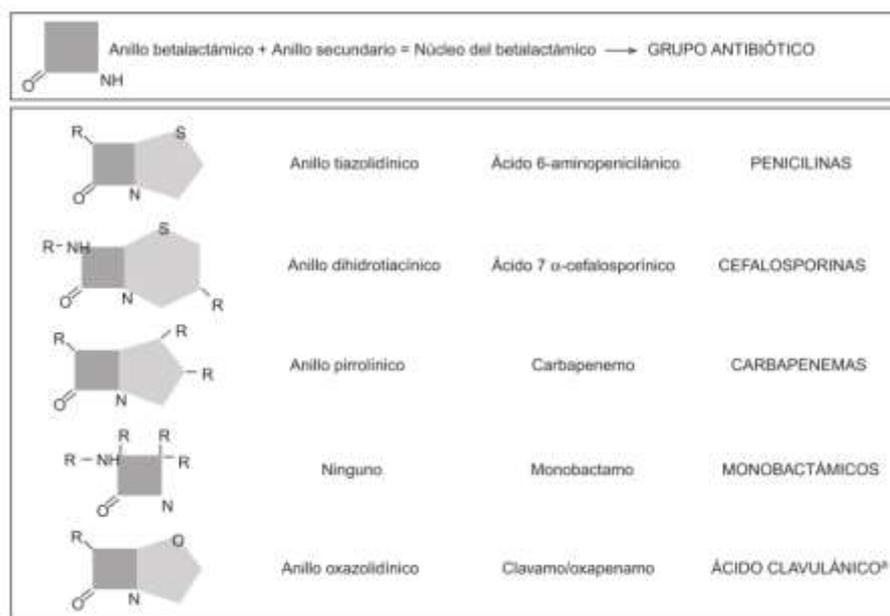


Figura 5 Estructura química de los betalactámicos. Todos los inhibidores de las betalactamasas que se usan en la práctica (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) tienen estructura betalactámica. El sulbactam y el tazobactam son derivados sulfónicos del ácido penicilánico (Suárez & Gudiol, 2009).

Clases de Antibióticos  $\beta$ -lactámicos:

1. Las penicilinas son derivadas del ácido 6-aminopenicilánico. Modificaciones en la cadena lateral del C6 afectan su espectro y características farmacocinéticas. Se dividen en cinco grupos según cambios estructurales: naturales, resistentes a penicilinasas, aminopenicilinas, carboxipenicilinas y acilureidopenicilinas. Las naturales y las resistentes a penicilinasas son efectivas principalmente contra bacterias Gram positivas (Doi & Chambers, 2014; Suárez & Gudíol, 2009).

2. Cefalosporinas son derivadas del hongo *Cephalosporium acremonium*. Clasificadas en cinco generaciones según su actividad antibacteriana. Cada generación muestra un espectro de actividad diferente, desde Gram positivos hasta Gram negativos (Andes et al., 2009; Karlowsky et al., 2013; Pucci & Bush, 2013).

Las cefalosporinas de primera generación (C1G) incluyen antibióticos como cefalexina y cefazolina. Son efectivos principalmente contra bacterias Gram positivas y algunas Gram negativas (Karlowsky et al., 2013).

Las cefalosporinas de segunda generación (C2G) como cefuroxima y cefaclor. Tienen un espectro más amplio que la primera generación, con mayor actividad contra Gram negativas (Rivas et al., 2002; Zamora et al., 1998).

Las cefalosporinas de tercera generación (C3G), como ceftriaxona, ceftazidima y cefoperazona, son ampliamente utilizadas debido a su efectividad contra bacilos Gram-negativos, especialmente enterobacterias (excepto cepas productoras de cefalosporinasas y/o  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido), *Haemophilus influenzae*, *Neisseria* spp., *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae*. Algunas de estas cefalosporinas también son activas frente a *Pseudomonas aeruginosa* (Chaudhry et al., 2019; DePestel et al., 2008; Mella et al., 2001; Werth, 2024).

Las cefalosporinas de cuarta generación (C4G) como la cefepima, son cefalosporinas con un espectro de actividad amplio, incluyendo aquellas que producen  $\beta$ -lactamasas (Chaudhry et al., 2019).

El cefiderocol, es una cefalosporina sideróforo inyectable desarrollada por Shionogi y colaboradores en Japón, es estructuralmente similar a ceftazidima y cefepima, pero

con alta estabilidad frente a  $\beta$ -lactamasas como AmpC (cefalosporinas) y BLEE (Zhanel et al., 2019).

3. Los monobactámicos consisten en un único anillo  $\beta$ -lactámico. Altamente estables frente a las metalo  $\beta$ -lactamasas. Aztreonam es el único antimicrobiano disponible en aplicaciones clínicas dentro de esta categoría, siendo altamente eficaz contra bacterias Gram negativas aeróbicas (Doi & Chambers, 2014; Suárez & Gudiol, 2009).

4. Carbapenemes fusionan el anillo  $\beta$ -lactámico con un anillo pirrolidínico, haciéndolos más resistentes a las  $\beta$ -lactamasas. Tienen un amplio espectro, incluyendo microorganismos productores de BLEE. No son efectivos contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SAMR), Enterococos Vancomicina resistentes (EVR) y *Xanthomonas maltophilia* (Suárez & Gudiol, 2009).

5. Inhibidores de  $\beta$ -lactamasas derivan de  $\beta$ -lactámicos y tienen una débil actividad antibacteriana. Actúan principalmente contra las  $\beta$ -lactamasas de clase A y en menor medida contra las de clase D (Ron, 2010). Ejemplos incluyen ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam capaces de inhibir  $\beta$ -lactamasas de clase A, C y D (Blanco et al., 1996; Johnson & Stell, 2000; Werth, 2024).

#### **4.A.3. Uso de antibióticos $\beta$ -lactámicos en producción animal**

Los antibióticos en la producción animal se usan con objetivos terapéuticos y preventivos. Anteriormente, se empleaban como aditivos en la alimentación para fomentar el crecimiento, pero esta práctica ya no está permitida en Europa. Su uso en veterinaria ha generado preocupación por el aumento de la RAM y sus efectos en la salud humana y animal (Torres & Zarazaga, 2007). Las pautas para su uso difieren entre la medicina veterinaria y humana, incluyendo lapsos entre la administración y el sacrificio de animales, y límites de residuos en alimentos (Torres & Zarazaga, 2007). Hay discrepancias en su uso entre animales de compañía y aquellos destinados al consumo humano, donde la economía juega un papel importante (Torres & Zarazaga, 2007). En la Tabla 1 se detallan los  $\beta$ -lactámicos empleados en medicina veterinaria en España, junto con las especies animales en las que se aplican y sus principales indicaciones. Las penicilinas son comúnmente usadas en medicina veterinaria, mientras que las cefalosporinas se usan principalmente en animales de compañía para tratar infecciones respiratorias y urinarias, entre otras (Torres & Zarazaga, 2007).

Tabla 1 Antibióticos  $\beta$ -lactámicos usados en medicina veterinaria en España

Abióticos $\beta$ -lactámicos		
Grupo	$\beta$ -lactámicos	Indicaciones
Penicilinas	Ampicilina, amoxicilina, bencilpenicilina	Todas las especies productoras de alimentos
	Cloxacilina, dicloxacilina, oxacilina, nafcilina, fenoximetilpenicilina	Todas las especies productoras de alimentos. Todos los rumiantes. Uso intramamario. Aves de corral (no ponedoras), porcinos.
Cefalosporinas de 1ª generación	Cefazolina	Bovino, caprino, ovino. Uso intramamario
	Cefalexina, cefapirina, cefalonio	Bovino. Uso intramamario
Cefalosporinas de 3ª generación	Cefoperazona	Bovino. Uso intramamario
	Ceftifur*	Todas las especies de mamíferas productoras de alimentos
Cefalosporinas de 4ª generación	Cefquinoma	Bovino, porcino, equino

Fuente: modificado de Torres, C., & Zarazaga, M. (2007). BLEE en animales y su importancia en la transmisión a humanos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 25(2), 29-37.

En términos generales, las cefalosporinas de primera generación son utilizadas para el tratamiento de mastitis en el ganado lechero. El ceftiofur, una cefalosporina de tercera generación de uso exclusivo veterinario, encuentra aplicación en todo el mundo (Europa, EEUU, Asia) para abordar enfermedades respiratorias en ganado bovino, ovino, caprino, equino y porcino. También se emplea en ciertos países de América, aunque no en Europa, para pollitos de un día, con el objetivo de prevenir la mortalidad temprana asociada a procesos septicémicos (Hornish & Katarski, 2005). Finalmente, la cefquinoma, una cefalosporina de cuarta generación también exclusivamente usada en medicina veterinaria, recibió autorización en Europa en 1994 y se emplea únicamente en tratamientos individualizados de ganado bovino o porcino. No se administra por vía oral en agua de bebida o en el alimento (Hornish & Katarski, 2005).

En Uruguay se comercializan diferentes  $\beta$ -lactámicos para uso veterinario los cuales se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2 Antibióticos  $\beta$ -lactámicos usados en medicina veterinaria en Uruguay

Grupo	$\beta$ -lactámicos	Vía de administración	Indicación
Penicilinas	Penicilinas naturales	Inyectable	Bovinos, ovinos, caprinos, suinos, equinos, caninos y gatos
	Amoxicilina	Inyectable	Bovinos, ovinos, caprinos, suinos, equinos, caninos y gatos
		Oral	Suinos, aves, caninos y gatos
	Penetamato	Inyectable	Bovinos
Cefalosporinas de 1 <sup>a</sup> generación	Cefalexina	Inyectable	Bovinos, ovinos, suinos, caninos y gatos
		Oral	Caninos y gatos
Cefalosporinas de 3 <sup>a</sup> generación	Cefovecin	Inyectable	Caninos y gatos
	Ceftiofur	Inyectable	Bovinos, ovinos, suinos, equinos y aves
Cefalosporinas de 4 <sup>a</sup> generación	Cefquinome	Inyectable	Bovinos, suinos

Fuente: GuíaVet. (2021). *Vademécum de especialidades veterinarias*. Uruguay. <https://guiavet.uy/>(GuíaVET, 2021)

## 4.B. Quinolonas

### 4.B.1.Generalidades

Las quinolonas son antimicrobianos sintéticos de amplio espectro. Han sido ampliamente utilizadas para tratar infecciones hospitalarias y comunitarias, especialmente en países en desarrollo debido a su disponibilidad económica en versiones genéricas (Pallecchi et al., 2012). Su eficacia se debe a su alta biodisponibilidad y seguridad, con opciones de administración oral y parenteral (Mehlhorn & Brown, 2007).

### 4.B.2. Clasificación y estructura química

Las quinolonas son compuestos con una estructura de dos anillos que incluyen un nitrógeno en la posición 1, un grupo carbonilo en la posición 4 y un grupo carboxilo en

la posición 3. Su efectividad se incrementa con un átomo de flúor en la posición 6 y un grupo piperacínico o metilpiperacínico en la posición 7, especialmente contra bacterias gramnegativas (Domagala, 1994; Peterson, 2001). Estas quinolonas se clasifican en generaciones según su espectro de actividad, similar a las cefalosporinas (Naber & Adam, 1998). Las de primera generación (ácido nalidíxico, ácido pipemídico) están en desuso y son activas principalmente contra enterobacterias. Las de segunda generación (norfloxacino) muestran una mayor actividad contra Gram negativos, aunque su uso está limitado en infecciones sistémicas. Las de tercera generación (ciprofloxacino, ofloxacino, levofloxacino) presentan mejor absorción oral y mayor actividad contra *P. aeruginosa*, grampositivos y patógenos atípicos. Las de cuarta generación (moxifloxacino) mejoran su actividad contra grampositivos y anaerobios, aunque son menos efectivas contra *P. aeruginosa* (Andersson M & MacGowan A, 2003; Ball, 2003).

#### **4.B.3. Mecanismo de acción de las quinolonas**

Las quinolonas afectan a las enzimas ADN girasas y topoisomerasas IV, codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB* o *parC* y *parD*, respectivamente. Estas enzimas son cruciales para regular el enrollamiento del ADN y desenredar el cromosoma bacteriano, facilitando la replicación y transcripción del ADN (Aldred et al., 2014). Las quinolonas forman complejos con estas enzimas y el ADN, causando cambios en su conformación y previniendo la religación del ADN. Este proceso detiene la replicación y lleva a la clivación del ADN, resultando en un efecto bactericida en los microorganismos sensibles (Collin et al., 2011).

#### **4.B.4. Uso de las quinolonas en producción animal**

Las fluoroquinolonas son antibióticos ampliamente utilizados en la medicina veterinaria debido a su alta absorción por vía oral en la mayoría de los animales, exceptuando rumiantes y posiblemente equinos, y su completa absorción por vía parenteral. Estos fármacos tienen una semivida de eliminación prolongada, un gran volumen de distribución, y una excelente capacidad de penetración en tejidos como el pulmonar, macrófagos alveolares, mucosas, y el tracto urinario, lo que les confiere una potente actividad intracelular contra diversos microorganismos (Brown, 1996; Wise, 1991).

Las fluoroquinolonas, como la enrofloxacin, son especialmente eficaces en el tratamiento de infecciones del tracto urinario y tejidos blandos en perros y gatos, así como en el control de colibacilosis en aves de corral. También se emplean en el tratamiento de infecciones profundas, prostatitis e infecciones bacterianas resistentes en animales (Brown, 1996). Estos antibióticos se eliminan principalmente a través de la excreción renal y el metabolismo hepático, y la enrofloxacin se metaboliza parcialmente a ciprofloxacina, lo que contribuye a su actividad antimicrobiana (Kaartinen et al., 1995). Además, se ha observado que las fluoroquinolonas pueden alcanzar concentraciones elevadas en la glándula mamaria (Hawkins et al., 1998; López, 1993).

En Uruguay se comercializan diferentes fluoroquinolonas para uso veterinario en la tabla 3 se detallan.

*Tabla 3 Antibióticos quinolonas usados en medicina veterinaria en Uruguay*

Grupo	Quinolonas	Vía de administración	Indicación
Quinolonas Fluoroquinolonas	Enrofloxacin	Inyectable	Bovinos, ovinos, caprinos, suinos, caninos y felinos
	Ciprofloxacina	Inyectable	Bovinos, ovinos, suinos, aves, caninos y felinos
		Oral	Suinos, aves, caninos y felinos
	Marbofloxacina	Inyectable	Bovinos, ovinos, caprinos, suinos, equinos, aves, caninos y felinos
	Danofloxacina	Inyectable	Bovinos

Fuente: GuíaVet. (2021). *Vademécum de especialidades veterinarias*. Uruguay. <https://guiavet.uy/>

## 4.C. Polimixinas

### 4.C.1.Generalidades

Las polimixinas son lipopéptidos cíclicos que se dividen en lineales y cíclicos. Aunque estructuralmente similares, tienen diferentes espectros de acción (Bryskier, 2014).

### 4.C.2. Clasificación y estructura química

Las polimixinas son lipopolipéptidos cíclicos con propiedades anfipáticas, compuestas por un decapeptido unido a una cadena de ácidos grasos (Yu et al., 2015). Presentan una carga policatiónica debido a los residuos de ácido alfa-gamma-di-aminobutírico y tienen substituyentes que contribuyen a su hidrofobicidad. Las polimixinas, como la polimixina B y la polimixina E (colistina), son utilizadas clínicamente para tratar

infecciones causadas por microorganismos multirresistentes (Bryskier, 2014; Li et al., 2006; Velkov et al., 2013). Sin embargo, su uso prolongado puede ocasionar efectos secundarios como neurotoxicidad y nefrotoxicidad. No son efectivas contra bacterias Gram positivas ni contra algunos microorganismos específicos como *Proteus* spp., *Providencia* spp., y otros (Navarro et al., 2011; Velkov et al., 2013).

#### **4.C.3 Mecanismo de acción de las polimixinas**

Las polimixinas actúan mediante la atracción electrostática con el lípido A de la membrana externa de bacterias Gram negativas. Se enlazan fuertemente a la membrana a través de interacciones de Van der Waals y se conectan con el lípido A mediante iones divalentes como calcio y magnesio (Yu et al., 2015). Esta interacción causa la liberación de iones y altera la estructura de la membrana, lo que lleva a daños y eventual muerte celular. Además, las polimixinas afectan la membrana interna al acceder al espacio periplásmico (Yu et al., 2015).

#### **4.C.4. Uso de polimixinas en producción animal**

En el ámbito humano, existen dos formulaciones comerciales de colistina: Colistina Metanosulfato Sódica (CMS) y Colistina Sulfato (CS) (Rhouma et al., 2016). La forma CS está aprobada para uso animal y se administra oral y tópicamente para controlar infecciones causadas por *Enterobacteriaceae*, especialmente *E. coli* (Guyonnet et al., 2010).

En ganadería, la colistina se usa principalmente de forma profiláctica, especialmente en cerdos (Catry et al., 2015), y también terapéuticamente y como promotor del crecimiento en varias especies como gallinas ponedoras, bovinos, ovinos y caprinos. Se administra oralmente en líquidos comerciales, alimentos, agua o incluso leche. Se emplea en combinaciones con otros antimicrobianos en algunos países europeos. También existen presentaciones parenterales e intramamarias. Además, la polimixina B está incluida en la lista de sustancias esenciales para el tratamiento de la endotoxemia asociada con cólicos severos y otros trastornos gastrointestinales en caballos (Barton M et al., 2004; Moore & Barton, 2003). En animales de compañía, las gotas para los ojos y los oídos recetadas pueden contener colistina sola o en combinación con otros antimicrobianos (EMA, 2010).

Los informes de ventas de antimicrobianos veterinarios de la FDA en 2010 y 2011 no reflejan ventas de polimixinas, aunque se han reportado casos de uso no autorizado

de polimixina B en caballos para tratar la endotoxemia (Moore & Barton, 2003). En Europa, la colistina se ha utilizado desde la década de 1950 (Kawahara et al., 1997), principalmente para cerdos en tratamientos grupales y prevención de diarreas causadas por *E. coli* y *Salmonella* spp., siendo la primera opción de tratamiento para la diarrea neonatal en lechones (Pardon et al., 2012) y terneros (Pardon et al., 2012) provocada por *E. coli*. Además, se utiliza para tratar la colibacilosis leve en aves de corral (Callens et al., 2012).

Aunque la colistina no está aprobada en ganadería en Canadá y Estados Unidos, la polimixina B, similar en estructura y acción, está autorizada. Se ha detectado el uso de colistina bajo supervisión veterinaria en Canadá (Rhouma et al., 2016).

En Uruguay, está prohibido el uso de productos veterinarios que contengan colistina para proteger la salud humana y animal (MGAP, 2019).

## **5. Mecanismo de resistencia bacteriana**

### **5.A. Generalidades**

La resistencia bacteriana es la capacidad de las bacterias para resistir los efectos de los antimicrobianos, ya sea de forma natural o adquirida (Jacoby, 2003). A lo largo del tiempo, las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia para contrarrestar los efectos de los antimicrobianos. Este fenómeno limita la eficacia de los tratamientos antibióticos, aumenta los costos de atención médica y puede generar infecciones difíciles de tratar e incluso incurables. Es crucial adoptar estrategias de uso responsable de antimicrobianos, desarrollar nuevos medicamentos y promover medidas de prevención y control de infecciones para abordar este problema de salud pública.

### **5.B. Genética molecular de la resistencia antimicrobiana**

La evolución microbiana depende de la variabilidad genética, esencial para la adaptación de los microorganismos a su entorno. Los antimicrobianos ejercen fuertes presiones selectivas, favoreciendo la resistencia microbiana (Rice & Chippindale, 2001). Esta variabilidad genética puede surgir por mutaciones puntuales, cambios macroevolutivos en el ADN bacteriano y la adquisición de ADN externo por transferencia horizontal (Lupski, 1987); en las bacterias el ADN externo puede estar portado por plásmidos, bacteriófagos, secuencias de ADN desnudo o elementos

genéticos transmitidos de otras bacterias (Medeiros, 1997). Los genes de resistencia a antimicrobianos pueden propagarse entre bacterias a través de diversos mecanismos, como transformación, transducción, conjugación o transposición (Gardner et al., 1969; Medeiros, 1997). Además, clones bacterianos con genes de resistencia pueden proliferar en la microbiota de pacientes tratados con antimicrobianos (Gardner et al., 1969; Medeiros, 1997).

### **5.B.1. Elementos de transferencia horizontal en *Enterobacteriaceae***

La transferencia horizontal es fundamental para la adaptación bacteriana a nichos específicos y la propagación de resistencia a antibióticos en la familia *Enterobacteriaceae* (Bennett, 2004; Frost et al., 2005). La estructura modular de los elementos de transferencia facilita el intercambio genético, otorgando plasticidad a las poblaciones bacterianas (Osborn & Böltner, 2002; Toussaint & Merlin, 2002). A continuación, se analizan los principales elementos genéticos móviles asociados con la propagación de la resistencia a antimicrobianos en la familia *Enterobacteriaceae*.

Los plásmidos son elementos genéticos circulares presentes en bacterias desde antes del surgimiento de los antimicrobianos en el siglo XX (Barlow et al., 2008; Gardner et al., 1969). La presión de selección de los antimicrobianos ha favorecido su propagación, especialmente de genes de resistencia (Barlow et al., 2008; Lupski, 1987; Medeiros, 1997). Además de la resistencia, los plásmidos pueden influir en funciones como la virulencia y el metabolismo, y se clasifican según criterios como el número de copias y la capacidad de transferencia (Osborn & Böltner, 2002; Taylor et al., 2004), siendo distinguibles entre plásmidos conjugativos y movilizables (Taylor et al., 2004).

Los transposones son elementos genéticos móviles que pueden desplazarse dentro del cromosoma bacteriano o entre cromosomas, plásmidos y ADN de bacteriófagos (Lupski, 1987; Rice & Chippindale, 2001). Codifican genes funcionales, incluyendo marcadores de resistencia antimicrobiana, y algunos pueden moverse entre bacterias, siendo cruciales en la evolución de la resistencia antimicrobiana (Brisson-Noel et al., 1988; Cohen, 1992; Hawkey, 1998)

Por otro lado, los integrones son estructuras genéticas que facilitan la transferencia e integración de genes de resistencia antimicrobiana (Recchia & Hall, 1997). Acumulan

genes, principalmente de resistencia a antibióticos, mediante recombinación mediada por una integrasa (Hall & Collis, 1998). Los integrones móviles, asociados con transposones y plásmidos, son comunes en aislamientos clínicos y facilitan la dispersión de genes de resistencia antimicrobiana entre bacterias (Hall & Collis, 1998).

### **5.B.2. Diseminación de la Resistencia**

La resistencia antimicrobiana puede transmitirse verticalmente a través de la descendencia bacteriana u horizontalmente entre bacterias de especies diferentes. La transmisión vertical implica la transferencia de material genético resistente a las bacterias hijas durante la reproducción celular, mientras que la transmisión horizontal implica la transferencia directa de genes entre bacterias. Esta última es la forma más común de propagación de resistencia, mediada por elementos genéticos como plásmidos, transposones e integrones. Estudios de Marchandin y colaboradores en 1999, han demostrado intercambios de genes de resistencia entre bacterias de diferentes orígenes y ambientes. Por ejemplo, se ha documentado la transferencia de genes de resistencia entre especies de la familia *Enterobacteriaceae* en contextos clínicos, evidenciando la capacidad de las bacterias para propagar la resistencia antimicrobiana entre diferentes especies (Marchandin et al., 1999).

### **5.B.3 Formas de intercambio genético entre bacterias**

La adquisición de ADN por bacterias receptoras puede ocurrir mediante transformación, donde el ADN se toma del medio ambiente y puede integrarse en el genoma del huésped (Torrades, 2001).

La transducción implica la transferencia de genes de resistencia entre bacterias compatibles a través de bacteriófagos, siendo especialmente relevante en cocos Gram positivos como *S. aureus* (Torrades, 2001).

La conjugación, por otro lado, es la vía principal de diseminación de genes de resistencia entre poblaciones bacterianas, siendo mediada por plásmidos y ocurriendo principalmente entre bacterias gramnegativas en contacto directo, como las enterobacterias en el intestino (Torrades, 2001).

A continuación, se describen los mecanismos de resistencia transferibles a los antimicrobianos de importancia crítica estudiados en este proyecto.

## 5.C. Mecanismo de resistencia a $\beta$ -lactámicos

Los mecanismos de resistencia a  $\beta$ -lactámicos, son básicamente tres: modificación del sitio blanco (PBP), alteración de la permeabilidad y bombas de eflujo e hidrólisis enzimática mediante producción de  $\beta$ -lactamasas (Suárez & Gudiol, 2009).

Se describe en detalle el mecanismo por hidrólisis enzimática mediante producción de  $\beta$ -lactamasas

### 5.C.1. Resistencia a los $\beta$ -lactámicos por inactivación enzimática

Las  $\beta$ -lactamasas son enzimas clave en la resistencia a los  $\beta$ -lactámicos, hidrolizando la unión amídica del anillo  $\beta$ -lactámico y desactivando el antibiótico. Las  $\beta$ -lactamasas representan un problema clínico relevante debido a su asociación con elementos genéticos móviles, lo que facilita su dispersión entre bacterias (Famiglietti et al., 2005).

Se clasifican en cuatro clases enzimáticas (A, B, C y D), cada una con diferentes mecanismos de acción (Ambler, 1980; Bush & Bradford, 2016; Nasrollahian et al., 2024). Existen más de 400 enzimas diferentes, siendo las más comunes las derivadas de TEM y SHV (Bush et al., 1995). Las  $\beta$ -lactamasas se agrupan funcionalmente según su capacidad para degradar ciertas clases de  $\beta$ -lactámicos y su susceptibilidad a inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (Bush & Jacoby, 2010).

El grupo I incluye cefalosporinasas, como AmpC, que son inducibles por  $\beta$ -lactámicos y se asocian principalmente con *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Bush & Jacoby, 2010). Las  $\beta$ -lactamasas AmpC son activas frente a cefalosporinas de primera a tercera generación, cefamicinas y monobactams, pero no contra carbapenemes ni cefalosporinas de cuarta generación. Suelen ser resistentes a inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, pero no a compuestos como cloxacilina, ácido borónico o nuevos inhibidores como avibactam (Bush & Jacoby, 2010; Jacoby, 2009; Nasrollahian et al., 2024; Navarro et al., 2010). Además, existen  $\beta$ -lactamasas de origen plasmídico, como CMY, ACT, DHA, FOX y MIR (Bush & Jacoby, 2010; Jacoby, 2009; Nasrollahian et al., 2024).

El grupo II comprende serin  $\beta$ -lactamasas, como TEM y SHV, que son activas frente a una amplia gama de  $\beta$ -lactámicos y pueden ser resistentes a inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. El subgrupo 2a, predominantemente cromosómico, se encuentra en

cocos Gram positivos como *Staphylococcus* spp. y, a veces, *Enterococcus* spp. (Bush & Jacoby, 2010). El subgrupo 2b hidroliza aminopenicilinas, carboxipenicilinas y cefalosporinas de primera generación, y está compuesto por enzimas como TEM-1, TEM-2 y SHV-1, conocidas como  $\beta$ -lactamasas de espectro ampliado (BLEA) (Bush & Jacoby, 2010).

Las BLEE, que están incluidas en el subgrupo 2be, derivan de sustituciones de aminoácidos en  $\beta$ -lactamasas de espectro ampliado (BLEA) como TEM-1, ampliando su espectro de acción. Estas enzimas actúan sobre penicilinas y oximiinocefalosporinas, pero no sobre cefamicinas, y son inhibidas por inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (Bush & Jacoby, 2010; Navarro et al., 2010). Las  $\beta$ -lactamasas derivadas de estas BLEA se denominan TEM-10 o SHV-5, entre otros (Livermore, 2008). Las BLEE CTX-M, relacionadas con  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de *Kluyvera georgiana* (*bla<sub>KLUC-1</sub>*), *Kluyvera ascorbata* (*bla<sub>KLUA</sub>*) o *Kluyvera cryocrescens* (*bla<sub>KLUC-1</sub>*), hidrolizan cefotaxima con mayor eficacia que ceftazidima y son mejor inhibidas por tazobactam que por ácido clavulánico (Bush & Jacoby, 2010).

El subgrupo 2br incluye BLEA resistentes al ácido clavulánico, mientras que el 2ber combina actividad BLEE con resistencia relativa al ácido clavulánico (Bush & Jacoby, 2010; Navarro et al., 2010; Ruggiero et al., 2017). También existen subgrupos menos comunes como 2c (PSE-1 y CARB-3), 2ce (CARB-10), 2d (enzimas OXA) y 2de (enzimas OXA con espectro extendido). El subgrupo 2df consiste en  $\beta$ -lactamasas OXA con actividad sobre carbapenemes, como OXA-23 y OXA-48 (Bush & Jacoby, 2010; Navarro et al., 2010).

El subgrupo 2e alberga las cefalosporinasas, mientras que el 2f incluye las serin-carbapenemasas, capaces de hidrolizar carbapenemes, algunas de ellas codificadas en plásmidos, como KPC o GES, asociadas con brotes intrahospitalarios (Bush & Jacoby, 2010).

El grupo III consiste en metalo- $\beta$ -lactamasas (MBL), que son capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes, pero no monobactams, y son inhibidas por compuestos quelantes de metales como el EDTA o el ácido dipicolínico, pero no por el ácido clavulánico ni el tazobactam (Bush & Jacoby, 2010). En la actualidad, se proponen dos subgrupos funcionales principales, 3a y 3b. El subgrupo 3a, el más relevante, incluye MBL plasmídicas que se encuentran principalmente en microorganismos no fermentadores (como IMP y VIM), pero también en enterobacterias. Estas enzimas muestran una alta capacidad de hidrólisis sobre

penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes, pero no sobre monobactams (Bush & Jacoby, 2010).

### 5.C.2. Principal grupo de BLEE de importancia en salud

Las  $\beta$ -lactamasas constituyen un mecanismo de resistencia bacteriana con un espectro diverso y de gran importancia tanto en la medicina humana como en la producción animal. A continuación, se resumen los principales grupos de estas enzimas con relevancia clínica humana y animal (Bradford, 2001; Bush & Bradford, 2016; Tzouveleki et al., 2012).

Las  $\beta$ -lactamasas tipo SHV incluyen la enzima SHV-1, que puede mutar y convertirse en variantes con perfil de BLEE, como SHV-2, SHV-5 y SHV-12, a través de cambios específicos en los aminoácidos. Estas enzimas se encuentran principalmente en enterobacterias y también en *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*. SHV-1 suele estar codificada en el cromosoma de *Klebsiella pneumoniae*, lo que sugiere que esta bacteria podría ser su fuente original (Bradford, 2001).

Las variantes TEM-3 y TEM-12 son derivadas de TEM-2, y su aparición es un ejemplo de cómo las BLEE pueden desarrollarse en respuesta a la presión selectiva de los antibióticos. Estas enzimas han sido relacionadas con infecciones bacterianas en animales, especialmente en entornos donde la presión antibiótica es elevada (Paterson & Bonomo, 2005).

Se han identificado ocho variantes de la enzima PER (PER-1 a PER-8), presentes en una amplia gama de huéspedes animales. La PER-1, inicialmente identificada en *Pseudomonas aeruginosa*, también se ha encontrado en *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* y *Acinetobacter spp.*, y ha sido responsable de brotes en diversos países. PER-2, en contraste, ha sido detectada sólo en América del Sur y se ha encontrado en varios patógenos animales, incluidos *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* (Naas et al., 2008).

Las  $\beta$ -lactamasas tipo CTX-M son actualmente las BLEE más prevalentes a nivel global en salud. Se caracterizan por su eficacia en la hidrólisis de C3G y por su resistencia a diversos antibióticos  $\beta$ -lactámicos, lo que dificulta el tratamiento de infecciones nosocomiales y comunitarias (Husna et al., 2023; Paterson & Bonomo, 2005).

Estas enzimas se dividen en cinco grupos principales según las similitudes en sus secuencias de aminoácidos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25. Cada grupo presenta características específicas en cuanto a afinidad y eficacia frente a ciertos antibióticos, lo cual impacta su potencial de resistencia y respuesta a tratamientos (Cantón et al., 2012; Doi et al., 2017). Las CTX-M están ampliamente distribuidas geográficamente y son responsables de brotes significativos en diversas especies animales (Bonnet, 2004).

El genotipo CTX-M es particularmente transmisible debido a su ubicación en plásmidos conjugativos, permitiendo una rápida diseminación entre diferentes especies bacterianas y la co-resistencia con otros genes que confieren resistencia a múltiples clases de antibióticos. Esto representa un desafío significativo en el ámbito de la salud pública y veterinaria, ya que facilita la transmisión en ambientes hospitalarios y en la comunidad, donde la resistencia a los  $\beta$ -lactámicos y otros antimicrobianos se ha vuelto prevalente (Bevan et al., 2017; Husna et al., 2023).

Estas enzimas, presentes en plásmidos conjugativos, tienen la capacidad de asociarse con otros mecanismos de resistencia a diversos antibióticos más allá de los  $\beta$ -lactámicos, como aminoglucósidos, cloranfenicol, sulfonamidas, trimetoprim o tetraciclinas como se mencionó anteriormente. Además, con frecuencia están asociadas a secuencias de inserción como *ISEcp1*, *IS10*, *IS26* o *IS903*, así como a integrones de clase 1 complejos, especialmente a través de su vinculación con la secuencia de inserción atípica *ISCR1*, como se observa en el *InS21* (Mather et al., 2011; Rodríguez-Martínez et al., 2016).

### **5.C.3. *Escherichia coli* productoras de BLEE en animal y alimentos**

La detección de bacterias productoras de BLEE en animales se documentó por primera vez en el año 2000, con una cepa de *Escherichia coli* obtenida de un perro enfermo en España en 1998. Desde entonces, ha habido un aumento progresivo en las publicaciones que informan sobre la presencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE en animales destinados al consumo humano en países como España, Francia, Dinamarca, Reino Unido, Japón y China. También se han registrado casos en animales de compañía en España, Italia y Portugal, así como en animales salvajes en Portugal y otros países (Torres & Zarazaga, 2007).

Estos animales colonizados por cepas de *E. coli* productoras de BLEE se consideran posibles fuentes de infecciones multirresistentes en la comunidad, ya que pueden adquirir, mantener y transmitir genes de resistencia de otros organismos en su entorno. A partir de 2002, se ha observado un aumento en la detección de estas cepas en alimentos de origen animal en varios países, generando una considerable atención a nivel mundial (Torres & Zarazaga, 2007).

Se ha realizado una investigación exhaustiva en animales, especialmente en sistemas de producción a nivel internacional, sobre la resistencia antimicrobiana en microorganismos aislados de diversas muestras. A nivel regional, se han reportado aislamientos de *E. coli* con BLEE, como CTX-M-8, CTX-M-2 y la enzima AmpC de tipo CMY, en pollos listos para el consumo importados de países como Brasil, Argentina y Chile (Torres & Zarazaga, 2007). Recientemente, en Uruguay, se ha identificado la presencia de cepas de *E. coli* con potencial zoonótico que portan genes de resistencia transferibles a quinolonas (*qnrB* o *qnrS*) y BLEE CTX-M-14, aisladas de terneros neonatos (Umpiérrez et al., 2017).

#### **5.D. Mecanismos de resistencia a quinolonas**

Los mecanismos de resistencia a quinolonas incluyen: alteraciones del sitio blanco producto de mutaciones puntuales, alteraciones de la permeabilidad y bombas de eflujo, enmascaramiento del sitio blanco y modificación enzimática. Debemos tener en cuenta que estos mecanismos pueden encontrarse codificados a nivel cromosómico o plasmídico.

##### **5.D.1. Resistencia plasmídica a quinolonas (PMQR)**

Enmascaramiento del sitio blanco: Se han identificado siete variantes de genes *qnr*, incluyendo *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrE*, *qnrS* y *qnrVC* (Wang et al., 2009). Además de estas variantes plasmídicas, también se han encontrado genes *qnr* localizados en el cromosoma (Martínez-Martínez et al., 1998; Robicsek et al., 2006b; Tran & Jacoby, 2002). Las proteínas Qnr, formadas por 218 aminoácidos, pertenecen a una familia de repeticiones pentapeptídicas, cuyo mecanismo de acción protege a la ADN-girasa y la topoisomerasa IV de las quinolonas, al interferir con su unión al ADN (Tran et al., 2005). En particular, QnrA puede revertir la inhibición de las fluoroquinolonas sobre la ADN-girasa al unirse directamente a esta enzima (Tran et al., 2005).

La presencia de *qnr* incrementa significativamente la concentración inhibitoria mínima (CIM), es decir, la mínima concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento bacteriano *in vitro*, especialmente frente a fluoroquinolonas como ciprofloxacina y levofloxacina. Las quinolonas inducen el regulón SOS (Nordmann & Poirel, 2005), y se ha sugerido que las proteínas Qnr podrían tener un papel protector como antitoxinas de las topoisomerasas de tipo II o estar involucradas en la respuesta SOS (Tran et al., 2005). Además, los genes *qnrB* y *qnrD* son regulados por la respuesta SOS tras el daño en el ADN inducido por fluoroquinolonas y  $\beta$ -lactámicos (Saga et al., 2013)

Modificación enzimática: Aac(6')-Ib-cr: Los mecanismos de resistencia a antibióticos incluyen la reducción de la concentración intracelular del fármaco y la modificación del sitio de acción. Aunque la resistencia enzimática suele ser específica de una clase de antibióticos, algunas mutaciones pueden generar resistencia a múltiples clases. Por ejemplo, mutaciones en el gen *aac(6')-Ib* confieren resistencia a aminoglucósidos y fluoroquinolonas (Chen et al., 2012; Liu et al., 2008). La variante mutada *aac(6')-Ib-cr* incrementa la resistencia a fluoroquinolonas, aunque disminuye la CIM para aminoglucósidos. Se han identificado varias variantes de la enzima Aac(6')-Ib-cr, todas ellas confiriendo resistencia a quinolonas (Chen et al., 2012; Liu et al., 2008).

Bombas QepA y OqxAB: En 2007, se describieron plásmidos portadores del gen *qepA* en Japón y Francia, que codifican la proteína transmembrana QepA, perteneciente a las bombas de tipo MSF, con alta especificidad de sustrato para norfloxacina, ciprofloxacina y enrofloxacina (Chen et al., 2012). La presencia de QepA puede incrementar hasta 40 veces la resistencia a estos antibióticos, aunque su prevalencia sigue siendo baja (Liu et al., 2008). Por otro lado, la bomba OqxAB confiere resistencia a múltiples antibióticos, incluyendo ciprofloxacina y ácido nalidíxico (Hansen et al., 2007). Esta proteína, codificada por los genes *oqxA* y *oqxB*, pertenece a la familia de bombas de eflujo tipo RND y puede estar presente en plásmidos o cromosomas (Rodríguez-Martínez et al., 2016).

Todos los mecanismos de resistencia mediada por plásmidos a las fluoroquinolonas (PMQR) reducen la susceptibilidad a estos antibióticos, aunque no siempre alcanzan los puntos de corte de resistencia clínica (Perez et al., 2013). Las variantes QnrA, QnrB, QnrC, QnrD y QnrS incrementan las CIM de ácido nalidíxico y ciprofloxacina

entre 4-16 y 8-32 veces, respectivamente (Rodríguez-Martínez et al., 2013; Wang et al., 2009). Las enzimas Aac(6')-Ib-cr confieren niveles más bajos de resistencia a fluoroquinolonas en comparación con las proteínas Qnr, mientras que las bombas de eflujo OqxAB y QepA pueden aumentar la CIM entre 16-128 y 32 veces, respectivamente (Hansen et al., 2007; Perez et al., 2013; Rodríguez-Martínez et al., 2013).

La enzima codificada por el gen *aac(6')-Ib-cr* suele encontrarse asociada a BLEE, especialmente de tipo CTX-M-15, junto con genes *qnrB1* (Bado et al., 2016; Liu et al., 2008). Además, la asociación entre diferentes mecanismos PMQR es frecuente, como la combinación de *qnrS* con *oqxAB* (Sato et al., 2011). Por último, QepA suele estar coligado al gen *rmtB*, que codifica una metilasa responsable de la resistencia a aminoglucósidos (Liu et al., 2008).

#### 5.D.2. Distribución del gen *qnr*

El gen *qnrA* ha sido detectado en todos los continentes, con una fuerte relación con aislamientos asiáticos y en enterobacterias clínicamente comunes como *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *C. freundii*, *P. stuartii*, *Salmonella* serovar Concord, *P. mirabilis*, y *S. marcescens*, aunque no en *P. aeruginosa*, pero sí en *Acinetobacter* spp. (Robicsek, et al., 2006a; Rodríguez-Martínez et al., 2016). El gen *qnrB* ha sido identificado en diversas especies, incluyendo *C. koseri*, *C. freundii*, *E. coli*, y *K. pneumoniae* en países como Estados Unidos, India, y Argentina (Robicsek, Jacoby, et al., 2006; Rodríguez-Martínez et al., 2016).

El *qnrS* se ha encontrado en *S. marcescens*, *S. flexneri*, y *Salmonella* no-typhi en Japón, Vietnam, y Alemania, mientras que *qnrC* fue hallado en *P. mirabilis* en China, y *qnrD* en *P. rettgeri*, *P. vulgaris*, y *Salmonella* spp. en Europa (Rodríguez-Martínez et al., 2016; Wang et al., 2009). *qnrVC* se ha detectado principalmente en microorganismos no fermentadores en India y Brasil (Rodríguez-Martínez et al., 2016), y en 2016 se describió el gen *qnrE* en *K. pneumoniae* en Argentina, con origen cromosómico en *Enterobacter* spp. (Albornoz et al., 2017).

### 5.D.3. Resistencia transferible a quinolonas circulando en humanos y animales en Uruguay

En nuestro país, se ha detectado la presencia de *qnrA1*, *qnrB1*, *qnrB4*, *qnrB8-like*, *qnrB13*, *qnrB17*, *qnrD*, *qnrS* y *qnrVC6* (Bado et al., 2010, 2016; Bado et al., 2018a; Robino et al., 2014; Seija et al., 2015; Umpiérrez et al., 2017; Vignoli et al., 2006).

Recientemente, en Uruguay se ha detectado la presencia de genes de resistencia transferible a quinolonas (*qnrB* o *qnrS*) en aislamientos humanos de *Salmonella enterica* (Cordeiro et al., 2016a), en aislamientos potencialmente zoonóticos de *E. coli* aislados de terneros neonatos (Umpiérrez et al., 2017), y en aislamientos de *E. coli* de origen humano (García-Fulgueiras et al., 2020; Robino et al., 2014).

### 5.E. Mecanismo de resistencia a la polimixina

Las bacterias Gram positivas son naturalmente resistentes a las polimixinas debido a la falta de LPS en su membrana. Las bacterias Gram negativas pueden desarrollar resistencia mediante modificaciones en la membrana externa, reduciendo los niveles de LPS o alterando el lípido A. Esta resistencia puede ser natural o adaptativa, y se debe a la reducción de la interacción entre las polimixinas y el lípido A (Yu et al., 2015).

#### 5.E.1. Mecanismo plasmídico de resistencia a polimixina

El primer mecanismo de resistencia transferible a colistina, conocido como *mcr-1*, codifica una fosfoetanolamina transferasa que modifica el lípido A en la pared bacteriana, evitando la interacción con la colistina y confiriendo resistencia a esta en bacterias como *E. coli* y *K. pneumoniae* (Baron et al., 2016; Borowiak et al., 2017a; Carattoli et al., 2017a; Liu et al., 2016, 2017; Xavier et al., 2016; Yin et al., 2017).

El gen *mcr-1* se ha encontrado en una amplia variedad de microorganismos y en muestras ambientales, animales, alimentos y seres humanos. Ha sido asociado con otros mecanismos de resistencia y con clones exitosos como ST131 y ST258 (Baron et al., 2016; Hasman et al., 2015). El gen *mcr-1* fue hallado en un plásmido de 64 kb de tipo IncI2, en un aislamiento de *E. coli* proveniente de un cerdo. De forma retrospectiva, los autores encontraron el mismo gen en aislamientos provenientes de animales, carne y muestras clínicas de humanos (Gao et al., 2019). Su aparición en criaderos de animales ha llevado a la contaminación del ambiente y a la propagación global de la resistencia a la colistina (Che et al., 2023; Dominguez et al., 2019; Moreno et al., 2019; Wang et al., 2020).

Hasta la fecha, se han descubierto variantes de *mcr-1.1* a *mcr-1.36* y de *mcr-2* a *mcr-10* en más de 40 países en cinco continentes (Che et al., 2023; Ling et al., 2020; Wang et al., 2020; Wang et al., 2018). A pesar de esto, *mcr-1* sigue siendo el gen de resistencia a la colistina más frecuente entre las bacterias de origen animal (Abd et al., 2020).

### 5.E.2. Circulación de genes *mcr*

La descripción de los nueve genes de resistencia transferibles a colistina en animales y seres humano eleva el nivel de alerta, porque muchas veces es la última alternativa disponible para tratar infecciones causadas por microorganismos multidrogo-resistentes (Carretto et al., 2018; Liu et al., 2017; Poirel et al., 2018; Rebelo et al., 2018; Wang et al., 2018; Xavier et al., 2016; Yin et al., 2017). Existen variantes alélicas en varios genes *mcr*. Dentro de los países latinoamericanos que han reportado genes *mcr* destacamos Argentina y Brasil por ser países limítrofes y debido a las relaciones comerciales existentes con ellos (Fernandes et al., 2016).

Precisamente, el trabajo de Fernandes *et al.*, propone que la circulación no detectada de clones de *E. coli* en humanos o animales de granja, podría ser la fuente de diseminación de dicho mecanismo en Europa (Fernandes et al., 2016).

Dichos autores reportan la presencia de *mcr-1* en microorganismos con valores de concentración inhibitoria mínima de 1 µg/ml, para puntos de corte de sensibilidad ≤ 2µg/ml. En los aislamientos detectados en Brasil, la presencia de *mcr-1* se asoció a BLEE de tipo *bla*<sub>CTX-M-8</sub> y *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (Fernandes et al., 2016).

En el segundo trimestre del 2018, se reporta la presencia de *mcr-3* en *E. coli* aislado de cerdos también asociada a *bla*<sub>CTX-M-8</sub> en Brasil, siendo este el primer informe de una variante distinta de *mcr-1* en el continente (Kieffer et al., 2018).

En nuestro país hasta el momento hemos detectado tres aislamientos de *E. coli* productores de *mcr-1* provenientes de pacientes que consultaron tanto en centros de asistencia públicos como privados (Papa-Ezdra et al., 2020).

# **CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS**



## CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es un problema global que tiene un impacto creciente en la salud humana, animal y la economía. Su importancia ha sido reconocida por organismos internacionales como la OMS, FAO, OMSA y PNUMA, que han advertido que, sin acciones coordinadas y concretas, las consecuencias para la salud animal y humana serán devastadoras en los próximos años. El enfoque "Una Salud" aborda esta problemática desde una perspectiva integral, considerando los aspectos ambientales, animales y humanos de manera interrelacionada.

En 2017, la OMS clasifica los microorganismos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos, destacando a las enterobacterias resistentes a carbapenemes y/o cefalosporinas de tercera generación como de alta prioridad. Estos microorganismos suelen portar otros mecanismos de resistencia, como las BLEE y carbapenemasas, lo que agrava la situación y reduce las opciones terapéuticas disponible. A finales de 2015, se reportó por primera vez un mecanismo transferible de resistencia a colistina, denominado *mcr-1*, detectándose incluso en aislamientos de años anteriores, lo que sugiere una diseminación no detectada previamente. Uruguay, como miembro de la OMS, se comprometió a aumentar la conciencia sobre la RAM, mejorar la vigilancia e investigación, reducir la incidencia de enfermedades infecciosas, optimizar el uso de antimicrobianos y garantizar financiamiento sostenido

En nuestro país, el MGAP ha implementado regulaciones para controlar el uso de antibióticos en la producción animal, prohibiendo el uso de antibióticos como promotores de crecimiento en bovinos y ovinos. Además, prohíbe la importación, exportación, fabricación, venta y uso de productos veterinarios que contengan colistina en todas las especies animales, protegiendo tanto la salud humana como en la animal.

Este trabajo tiene como objetivo aportar conocimiento sobre aspectos clave de la RAM. Se seleccionaron enterobacterias, en particular *Escherichia coli*, como indicador microbiológico debido a su relevancia para la salud animal. El proyecto proporcionó información sobre la presencia de *E. coli* resistentes a antimicrobianos críticos, aisladas de muestras fecales de aves, cerdos y terneros, así como de enterobacterias aisladas de pollitos de un día importados de Brasil.

## HIPÓTESIS

1. Existen aislamientos de *Escherichia coli* en muestras fecales de terneros de leche, cerdos y aves en producción de Uruguay resistentes a antibióticos de importancia crítica para la salud humana.
2. Existen aislamientos de enterobacterias en muestras fecales de pollitos de un día de vida importados de Brasil resistentes a antibióticos de importancia crítica para la salud humana

# OBJETIVOS



## OBJETIVOS

### 1. Objetivos Generales

1-Determinar la presencia de *E. coli* resistentes a antimicrobianos de importancia crítica en muestras fecales de terneros de leche, aves y cerdos de Uruguay.

2-Determinar la presencia de enterobacterias resistentes a antimicrobianos de importancia crítica en muestras fecales de pollitos BB de un día importados de Brasil.

### 2. Objetivos Específicos

- Estudio de susceptibilidad a antimicrobianos en los aislamientos de enterobacterias resistentes a antibióticos críticos
- Determinar la presencia de genes codificantes de  $\beta$ - lactamasas activas sobre oximinocefalosporinas, en aislamientos de enterobacterias.
- Determinar la presencia de genes de resistencia transferibles a quinolonas en aislamientos de enterobacterias.
- Determinar la presencia de genes *mcr* en aislamientos de enterobacterias.
- Determinar la clonalidad de los aislamientos resistentes a colistina en los sistemas de producción de Uruguay y en pollitos de un día de vida importados de Brasil.
- Verificar la transferencia horizontal de genes de resistencia en los aislamientos resistentes a oximinocefalosporinas detectados.



# **ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

### 1. Actividades de campo

Se realizaron muestreos de materia fecal en aves y cerdos en producción. La selección de los establecimientos avícolas se coordinó con la Asociación de Productores Avícolas del SUR, mientras que el Departamento de Animales de Granja de la Facultad de Veterinaria, bajo la dirección del Dr. Gustavo Castro, se encargó de la selección de los establecimientos porcinos. Además, se utilizaron aislamientos de *E. coli* obtenidas de materia fecal de terneros provenientes de establecimientos lecheros, que fueron cedidas por el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) y conservadas a -20 °C y -80 °C.

### 2. Actividades de laboratorio

Por muestra fecal de terneros se aislaron e identificaron (métodos bioquímicos) entre 4 y 5 cepas de *Escherichia coli*. Estas cepas se conservaron en la colección del IIBCE en TSB-Glicerol 15%, a -20 °C y -80 °C. Para las muestras de materia fecal de cerdos, aves de producción de Uruguay y pollitos importados de Brasil, se realizó un pre-enriquecimiento en caldo nutritivo.

Se sembraron tanto las cepas de *E. coli* como los caldos de pre-enriquecimiento en medios selectivos para buscar microorganismos resistentes a antimicrobianos. La identidad de los aislamientos resistentes se confirmó mediante MALDI-TOF. Los perfiles de resistencia se establecieron utilizando el método de disco difusión de Kirby-Bauer en agar Mueller-Hinton, conforme a las normas CLSI 2021-2024. La presencia de genes de resistencia se analizó por PCR, y los plásmidos que portan estos genes se investigaron mediante ensayos de conjugación.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Cepas de *E. coli* en terneros de leche**

En el trabajo de investigación retrospectivo de los terneros de leche se trabajó con cepas de *E. coli*, que fueron previamente recolectadas en proyectos anteriores, que posee el IIBCE. Las cepas de *E. coli* fueron obtenidas de muestras de heces de terneros con diarrea neonatal (DNT) y sanos, provienen de 11 establecimientos con ocurrencia de DNT, identificadas mediante pruebas bioquímicas (test de oxidasa, triple azúcar hierro, citrato de Simmons, ornitina- indol-movilidad, fenilalanina, lisina descarboxilasa y fermentación de azúcares), analizando los resultados en base a tablas de identificación (Murray et al., 2003). Se establecieron cuáles eran los establecimientos afectados y se muestrearon 10 animales enfermos y 10 animales sanos en cada caso. Por cada animal (muestra) se seleccionaron de 5 a 7 aislamientos de *E. coli*. Luego los aislamientos fueron remitidos al Departamento de Microbiología del IIBCE donde se almacenaron en TSB-Glicerol 15%, estéril, a -20°C y a -80°C para estudios posteriores. Para este trabajo se seleccionaron 5 de los 11 establecimientos muestreados.

### **2. Elección de los establecimientos de producción de cerdos, muestreo**

La elección de los establecimientos de producción de cerdos se hizo por medio del Departamento de Animales de Granja de la Facultad de Veterinaria, UdelaR. Se tomaron muestras fecales directamente del ano de los animales con guante o hisopo dependiendo de la categoría del animal. Se seleccionaron 5 establecimientos y, se muestrearon 10 animales por establecimiento. La colecta de las muestras se realizó por personal idóneo (Veterinarios/as).

### **3. Elección de granjas avícolas, muestreo**

La elección de los establecimientos avícolas se hizo de acuerdo a los registros de la Asociación de Productores Avícolas SUR. Se tomaron muestras de heces de pollos parrilleros y gallinas ponedoras (hisopados cloacales). Se seleccionaron 13 establecimientos aviares, muestreando 10 animales por establecimiento (10 hisopados cloacales).

#### **4. Muestreo de fondos de cajas de pollitos de un día importados de Brasil**

También se realizó el muestreo de materia fecal de pollitos de un día de vida (reproductores livianos y/o pesados) importados de Brasil de 8 embarques en total. Los mismos llegaron al Aeropuerto de Carrasco en cajas que contienen 200 pollitos sub- divididos en lotes de 50 aves, se realizó un barrido del fondo de la caja de cada cuadrante con hisopo estéril, formado un pool por cada caja. La colecta de las muestras de hisopados cloacales y de fondo de caja se realizó por personal técnico de la Asociación de Productores Avícolas SUR.

Todas las muestras fueron remitidas a 4°C al laboratorio del Departamento de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene de la Facultad de Medicina de la Udelar y procesadas en un lapso de 24 hs como se describe a continuación.

#### **5. Obtención de aislamientos resistentes a antimicrobianos**

Las muestras de materia fecal de aves/pollitos de un día y cerdos en producción se les realizó en pre-enriquecido en caldo Luria Bertani (Oxoid Ltd., Basingstoke, Reino Unido) y se incubó a 37°C durante 24 hrs. Se consideraron viables aquellas muestras que presentaron turbidez en el caldo de cultivo, siendo estas las únicas incluidas en los análisis posteriores.

Luego los caldos pre-enriquecidos con turbidez y las cepas de *E. coli* del IIBCE, fueron sembradas en medio selectivo agar MacConkey Lactosa (Oxoid Ltd., Basingstoke, Reino Unido), suplementado con ciprofloxacina 0,125mg/L (ION, Montevideo, Uruguay) o ceftriaxona 1 mg/L (Libra, Montevideo, Uruguay) o colistina 3 mg/L (Sigma-Aldrich St Louis MO USA) (Terveer et al., 2017), e incubadas a 37°C durante 24 hrs. Para cada muestra analizada, se seleccionaron los aislamientos de enterobacterias con morfología compatible y fermentación positiva de lactosa que crecieron en los medios con ciprofloxacina, ceftriaxona o colistina. En el caso de los terneros, se trabajó a partir de *E. coli* previamente aisladas, mientras que en cerdos, aves y pollitos BB, se utilizó el caldo pre-enriquecido con turbidez obtenido a partir de las muestras fecales. En una misma muestra, se podían recuperar uno o más aislamientos resistentes para su posterior análisis, o no presentar crecimiento, indicando la

ausencia de aislamientos resistentes. Además, un mismo aislamiento de ternero podía crecer en más de un medio suplementado con antibióticos o no crecer.

De esta manera, un mismo animal podía presentar uno o más aislamientos resistentes, ya que en una muestra podían recuperarse diversos aislamientos de enterobacterias resistentes a los distintos antibióticos evaluados, lo que permitió identificar uno o más aislamientos resistentes en cada animal o muestra analizada, o ninguno en caso de no haber crecimiento.

## **6. Identificación de los aislamientos y generación de bancos maestros**

La confirmación de la identidad de todos los aislamientos resistentes se realizó por MALDI-TOF (Bruker, Massachusetts, EUA) con el software Maldi Biotyper 3.1 (Seng et al., 2009). Continuamos trabajando con los aislamientos de *E. coli* en el caso de los terneros, aves y cerdos, y con todas las enterobacterias para el caso de los pollitos BB importados de Brasil. Además, los aislamientos fueron almacenadas a -80°C en TSB-Glicerol 15% estéril.

## **7. Estudios de susceptibilidad antimicrobiana**

La susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *E. coli* resistentes obtenidas de muestras fecales de animales de producción de Uruguay, se determinó mediante el método de disco difusión de Kirby-Bauer en agar Mueller-Hinton, siguiendo las normas Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) 2021 (CLSI, 2021). Los antimicrobianos testados fueron: amoxicilina-ácido clavulánico (AMC), ceftriaxona (CRO), ceftazidime (CAZ), cefepime (FEP), cefoxitin (FOX), imipenem (IMP), meropenem (MEM), ciprofloxacina (CIP), gentamicina (CN), amikacina (AK) y trimetoprim-sulfametoxazol (SXT). Los antibiogramas fueron incubados a 37°C durante 24 hrs. Los resultados fueron interpretados de acuerdo a el CLSI-2021; 2024 (CLSI, 2021, 2024).

Se evaluaron además por el test de sinergia la expresión de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido y cefalosporinas. La presencia de BLEE en enterobacterias se evidencio mediante el test de sinergia utilizando discos de CAZ-AMC-CRO, con una separación de los mismos de 1,5 a 2,0 cm, de borde a borde en placas de agar Müeller-Hinton.

Un aumento del halo de inhibición del  $\beta$ -lactámico hacia el inhibidor de la  $\beta$ -lactamasa fue considerado, test fenotípico positivo para BLEE (Vila & Marco, 2010).

Para el caso de las  $\beta$ -lactamasas de clase AmpC, a aquellos aislamientos resistentes a FOX, se realizó un test de sinergia para AmpC, utilizando discos de CAZ-ácido borónico (BOR)-CRO, con una separación de los mismos de 1,5 a 2,0 cm., de borde a borde en placas de conteniendo agar Müeller-Hinton para determinar su expresión. Si se observa un aumento de la zona de inhibición entre los discos de CAZ y CRO en presencia de BOR en comparación con la ausencia de BOR, esto sugiere que el aislamiento es positivo para  $\beta$ -lactamasas de tipo AmpC. Este resultado indica que el ácido borónico inhibe la actividad de AmpC, permitiendo que los antibióticos actúen y aumentando la zona de inhibición (Martínez Rojas, 2009).

Los resultados de susceptibilidad intermedia más los de resistencia se agruparon en en la categoría de no susceptibles (resistentes).

Para el caso de las enterobacterias resistentes de los pollitos de un día de vida importados de Brasil, el estudio de la susceptibilidad a los antimicrobianos se determinó mediante el sistema Sensititre utilizando placas ARGNF (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.) según las recomendaciones del fabricante. La susceptibilidad a fosfomicina se realizó mediante métodos de dilución en agar. Todos los resultados se interpretaron de acuerdo con el CLSI 2021 (CLSI, 2021), excepto la susceptibilidad a la fosfomicina, que se interpretó de acuerdo con el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST) (<http://www.eucast.org>).

Se determinó la CIM de colistina (COL) para los aislados de *E. coli* y enterobacterias recuperados de MacConkey suplementados con COL, mediante la prueba de colistina agar test (CLSI, 2021). A todos los aislamientos con crecimiento en medio con colistina se le realizó una dilución en placa, con concentraciones finales de 0  $\mu\text{g/ml}$  (control), 1  $\mu\text{g/ml}$ , 2  $\mu\text{g/ml}$  y 4  $\mu\text{g/ml}$ . La interpretación de los resultados se realizará siguiendo las normas de la CLSI-2021 (CLSI, 2021). Considerando que las MCR son familias de metaloenzimas, la presencia de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) inhibirá la acción de estas proteínas, limitando su capacidad para promover el crecimiento bacteriano únicamente en aquellos casos en que la resistencia a la colistina se deba a la expresión de MCR, y no cuando se deba a mecanismos cromosómicos. En todos los aislamientos resistentes a la colistina se llevó a cabo un screening de EDTA-colistina para determinar la presencia fenotípica de genes *mcr*, utilizando el método

de Screening “COLISTIN AGAR-SPOT/EDTA”, donde los aislamientos resistentes a la colistina y productores de MCR no pudieron crecer en las placas (Escalante et al., 2020).

Todos los controles de calidad fueron realizados utilizando la cepa de *E. coli* ATCC (American-Type Culture Collection) 25922.

## **8. Mecanismos de resistencia transferibles y ensayos de conjugación**

### **8.A-Extracción de ADN**

Se partió de un cultivo puro de las cepas en estudio, mediante aislamiento por estría en placa de Luria Bertani agar (LBA) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Reino Unido), suplementado con 1 µg/ml de ceftriaxona, y/o 0,125 µg/ml de ciprofloxacina y/o 3 µg/ml de colistina. Para la extracción de ADN se utilizó la técnica de lisis bacteriana con liberación de ADN por shock térmico, mediante la suspensión de tres colonias en 200µl de buffer TE-Triton al 1 x (EDTA 0.1M, TRIS-HCl 1M, Buffer Triton, agua destilada). Posteriormente, dichas suspensiones fueron llevadas a termobloque a 100°C por 10 min., congeladas durante 5 min. y centrifugadas durante 10 min. a 13.000 rpm. El sobrenadante resultante fue colocado en un nuevo tubo para centrifuga Eppendorf (descartando el pellet conteniendo restos celulares) y utilizado como molde para las PCR.

### **8.B- Preparación de las reacciones de amplificación**

La mezcla de reacción de PCR se preparó para un volumen final (mezcla de reactivos más ADN) de 25 µl. La concentración final de cada componente de la mezcla y los pasos de amplificación utilizados se indican para cada caso, según lo referenciado previamente, ajustando la temperatura de hibridación según lo expuesto en las tablas correspondientes (ver tabla 20 anexo)

Los genes de resistencia se buscaron mediante PCR y se confirmaron mediante secuenciación. Buscamos los genes de resistencia a los siguientes antibióticos:

a) colistina

La detección de genes de resistencia a colistina mediados por plásmidos *mcr-1 a -9* se detectaron mediante PCR según Rebelo et al., (2018), Carattoli et al. (2017), Borowiak et al. (2017) y Liu et al. (2018). (Ver tabla 15).

b) oximiinocefalosporinas

*bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>PER-2</sub>, *bla*<sub>AmpC</sub> ver tabla 14 (Garcia-Fulgueiras et al., 2017)

c) quinolonas

*aac(6)Ib-cr\**, *qnrA*, *B*, *C*, *D*, *S*, *Vc*, *qepA* (Garcia-Fulgueiras et al., 2017);

d) aminoglucósidos

La caracterización molecular de los aislamientos resistentes a aminoglucósidos se realizó por amplificación de los genes [*aac(6)Ib*, *armA*, *rmtA-H*, and *npmA*] (Bado et al., 2016; Papa-Ezdra et al., 2020)

e) fosfomicina (*fosA*, *fosA3*) (Ho et al., 2013a; Kobayashi et al., 2000).

\* Para analizar el gen *aac(6')-Ib-cr*, el cual codifica una variante de la enzima aminoglucósido N-acetiltransferasa, se llevó a cabo un protocolo donde el producto de amplificación del gen *aac(6')-Ib* fue sometido a digestión con enzimas de restricción específicas (*BseGI* o *FokI*) capaces de cortar dicho gen en sitios predefinidos. Las muestras fueron incubadas a 55 °C durante 3 horas en una mezcla conteniendo la enzima de restricción y su buffer correspondiente, seguido de una electroforesis en gel al 2 % de agarosa para evaluar los fragmentos resultantes. Aquellos fragmentos que no fueron digeridos se consideraron como variantes *aac(6')-Ib-cr*, las cuales presentaban una banda de 500 pb. En cambio, los fragmentos que fueron digeridos, resultando en dos bandas de 200 y 270 pb, fueron considerados negativos para dicha variante (Robicsek et al., 2006).

### 8.C- Visualización de productos de PCR

Para visualizar los productos de amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 - 2 %, según correspondiera. Se cargaron 20 µl de cada producto de amplificación más 4 µl de buffer de carga. En la corrida electroforética se incluyeron los correspondientes controles positivos, negativos y de mezcla, así como un marcador de peso molecular comercial NZYDNA Ladder V, 100-1000 bp para visualizar el tamaño de nuestros productos de amplificación. El voltaje aplicado fue de 100v. Una vez finalizada la corrida, se procedió a la tinción con bromuro de etidio 0.5 µg/ml durante un periodo aproximado de entre 10 a 20 min. y posterior observación al transiluminador de UV.

### 8.D- Secuenciación de amplicones

Los productos de PCR fueron purificados con kit comercial DNA Clean & Concentrator-5 (<https://zymoresearch.eu/products/dna-clean-concentrator-5>) y secuenciados utilizando cebadores específicos (ver tabla 4 Anexo 1). Se empleó un

secuenciador de ADN (ABI PRISM 3700), y el programa de la NCBI-BLAST se utilizó para buscar homología de las secuencias obtenidas y comparada con otras secuencias ingresadas previamente en bancos de datos (NCBI/ [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). Del mismo modo, se empleó el programa CHROMAS (versión 1.45, Griffith University, Queensland Australia) para analizar los cromatogramas.

#### **8.E- Movilidad de los mecanismos de resistencia**

Se llevaron a cabo ensayos de conjugación entre aquellos aislamientos portadores de genes transferibles de resistencia a CRO y/o COL como cepas donantes y como cepa receptora *E. coli* J53-2. Partiendo de un cultivo monomicrobiano, se cultivaron por separado, una colonia de las cepas donantes y receptores en 2 ml de caldo Luria-Bertani, durante 2 hs a 37 °C en agitación (200 rpm). Luego se transfirieron 200 µl de la cepa donante en 2000 µl de la cepa receptora y se dejaron en incubación a 37 °C durante toda la noche. Posteriormente, se sembraron 10 µl, 100 µl y el centrifugado de cada caldo de conjugación en placas de agar MacConkey Lactosa suplementados con rifampicina (150 mg/L) (Sigma–Aldrich, Shanghai, China) y ceftriaxona (1 mg/L) o colistina (3 mg/L). Aquellas colonias capaces de crecer en el medio conteniendo ambos antibióticos fueron consideradas transconjugantes. Simultáneamente, se llevaron a cabo controles de viabilidad mediante la siembra de las cepas donante y receptora en medios LBA, tanto sin antibióticos como con la adición de rifampicina y/o ceftriaxona.

Posteriormente se confirmó las cepas transconjugante positivo (Tc+) mediante pruebas bioquímicas como la búsqueda de la enzima ornitina descarboxilasa mediante siembra en el medio motilidad-indol-ornitina (MIO), sabiendo que la cepa receptora era negativa, antibiograma por disco difusión con test de sinergia para BLEE/AmpC, CIM en placa para COL y PCR para búsqueda de los genes de interés (Cordeiro et al., 2016).

#### **8.F- Grupos de incompatibilidad plasmídica**

Los grupos de incompatibilidad plasmídica se determinaron de acuerdo a la técnica de replicon *typing* mediante PCR para las cepas positivas en los ensayos de conjugación como fue comentado previamente (Tc+) (Tabla 21 anexo) (Llosa & De La Cruz, 2005). Para la visualización de los amplicones se realizó una corrida

electroforética con los correspondientes controles positivos, negativos y de mezcla como se mencionó anteriormente.

### **9. Estudio de la clonalidad: pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)**

Los análisis de diversidad de los aislamientos resistentes se llevaron a cabo mediante electroforesis en campo pulsado, empleando la enzima de restricción *XbaI* (Thermo Scientific, Waltham, MA) y siguiendo los protocolos establecidos por PulseNet, utilizando 30 unidades por bloque, 37° durante 18 horas. El gel para la corrida electroforética se preparó al 1% y las condiciones de corrida utilizadas fueron: 6 volts, durante 18 horas, pulso inicial 2.2 seg, pulso final 54,2 seg. Se utilizó como cepa control un aislamiento de *Salmonella* enterica serovar Braenderup (<http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/ecoli-shigellasalmonella-pfge-protocol-508c.pdf>), (Swaminathan et al., 2001). Al finalizar la electroforesis, el gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio (BrEt) (1 µg/ml) durante 30 minutos y luego se destiñó con agua mQ durante el mismo tiempo. Posteriormente, el gel se visualizó bajo luz UV.

Los árboles filogenéticos se realizaron utilizando el sistema BioNumerics 6.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica) con una tolerancia del 2%. Se consideran similares aquellos aislamientos que posean una similitud mayor o igual a 85% (Wirth et al., 2006).

### **10. Multi-locus sequence typing**

La caracterización de los secuenciotipos (ST) circulantes se llevó a cabo para las *E. coli* portadoras de *mcr-1* mediante PCR y posterior secuenciación para la porción interna de los genes *housekeeping* (ver Tabla 22 Anexo), (Wirth et al., 2006). Los resultados se analizaron de acuerdo a lo estipulado por la Universidad de Warwick (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>). A cada gen se le asignó un alelo y los ST se determinaron de acuerdo a la combinación de los alelos obtenidos.

### **11. Secuenciación de genoma completo (WGS) (*E. coli* aisladas de pollitos BB)**

Para la secuenciación de genomas de lectura corta y larga, se extrajo ADN genómico utilizando el kit de aislamiento de ADN genómico (gDNA) NZY (NZYTech Genes & Enzimas, Lisboa, Portugal), siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad y cantidad del ADN se evaluaron mediante un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE).

Se seleccionaron cuatro aislamientos para la secuenciación de genoma completo (WGS) en función de sus perfiles de resistencia y los patrones obtenidos mediante electroforesis en gel de campo pulsado. La secuenciación se realizó utilizando la plataforma Illumina MiSeq-I con bibliotecas Nextera XT. Las lecturas se ensamblaron con SPADES v.3.11, empleando k-mers de 21, 33, 55, 77, 99 y 127, con la opción "careful" activada. Los cortes para los ensamblajes finales fueron un tamaño mínimo de contig/andamio de 500 pb y una cobertura mínima de nucleótidos de 10 veces.

De manera paralela, el aislamiento que contenían los genes *rmtG* y *mcr-9* se secuenció usando tecnología Nanopore de Oxford. Las bibliotecas de ADN se prepararon con el kit de secuenciación rápida (Sqkrad004), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las bibliotecas se cargaron en celdas de flujo R9.4.1 (Flomin106) y se secuenciaron durante 8 horas en un dispositivo MinION (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido). El análisis de las secuencias se llevó a cabo mediante el software Guppy con un modelo de alta precisión, integrado en MinKNOW v4.1.22. La calidad de los datos generados se evaluó con NanoPlot v1.33.1, y se utilizó Filtlong v0.2.0 para filtrar las lecturas menores de 2000 pb y aquellas con una puntuación de calidad promedio inferior a 93. El ensamblaje del genoma de novo se realizó con el ensamblador Flye v2.8.2 (Kolmogorov et al., 2019), con cuatro iteraciones de pulido y la opción de plásmidos activada para recuperar cualquier plásmido corto no ensamblado.

Las secuencias genómicas de los aislamientos que contenían los genes *rmtG* y *mcr-9* se ensamblaron de novo utilizando un enfoque híbrido con Unicycler v0.4.8 (Wick et al., 2017).

En cuanto al análisis *in silico*, la predicción de los genes de resistencia a antibióticos se realizó utilizando tanto la Base de Datos Integral de Resistencia a Antibióticos (criterios: perfectos y estrictos; calidad de secuencia: alta calidad/cobertura) (<https://card.mcmaster.ca/>) como la suite ResFinder 4.1 (Bortolaia et al., 2020). La detección de grupos de incompatibilidad de plásmidos se llevó a cabo utilizando PlasmidFinder 2.1 (umbral de identidad mínima: 95%; cobertura mínima: 60%) (Carattoli & Hasman, 2020), mientras que los secuenciotipos fueron predichos mediante MLST 2.0 (Larsen et al., 2012). Los plásmidos se anotaron utilizando RAST 2.0 (Rapid Annotation using Subsystem Technology) (Overbeek et al., 2014) y fueron curados

manualmente con el software Artemis (Carver et al., 2008). La comparación de plásmidos se realizó utilizando la aplicación Python Easyfig 2.2.2, para lo cual se generaron archivos BLASTn con un valor E máximo de  $10^{-23}$  (Sullivan et al., 2011). La predicción de regiones promotoras se llevó a cabo mediante la herramienta en línea BacPP (de Avila et al., 2011). Asimismo, se realizó la búsqueda de genes de virulencia mediante línea de comando de la aplicación Virulence Finder ubicada en la base, Abriicate.

Las secuencias de los plásmidos pUR-EC3.1, pUR-EC3.2 y pUR-EC3.3, junto con sus respectivas anotaciones, se depositaron en GenBank con los números de acceso MZ382870, MZ382871 y MZ382872, respectivamente. El transposón compuesto presente en pUR-EC3.2 fue designado como Tn7337 por The Transposon Registry (<https://transposon.lstmed.ac.uk/>) (número de acceso de GenBank MZ396394) (Tansirichaiya et al., 2019).

## 12. Análisis Estadístico

Se seleccionaron aleatoriamente animales en 5 establecimientos de bovinos (20 por establecimiento), 13 de aves (generalmente 10, rango de 5 a 20) y 5 de cerdos (10 por establecimiento).

Primeramente, se realizó estadística descriptiva para los tres grupos, mediante el uso de tablas, gráficas y medidas descriptivas adecuadas a las variables.

La variable respuesta fueron número de resistentes (positivos) en cada grupo, siendo ésta una variable categórica nominal, así como los grupos (establecimientos de bovinos, aves y cerdos) y el test estadístico utilizado fue el análisis de frecuencias con chi cuadrado. Los supuestos del test son, independencia de grupos, frecuencias esperadas no menores a n 5. Estos análisis se realizaron mediante la utilización del software R version 4.2.2 (2022-10-31 ucrt).

## RESULTADOS



## RESULTADOS

### SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE URUGUAY

#### 1. Mapa de los diferentes establecimientos/granjas muestreadas según la especie animal

En el mapa (Fig. 6) se observa la distribución geográfica de los establecimientos muestreados, correspondientes a tres sistemas de producción. Los establecimientos lecheros se encontraban en el departamento de Rio Negro (2/5) y San José (3/5). Para los establecimientos de cerdos, todos estaban en Canelones (5/5). Las granjas de aves se encontraban en Canelones (5/13) y Montevideo (8/13).

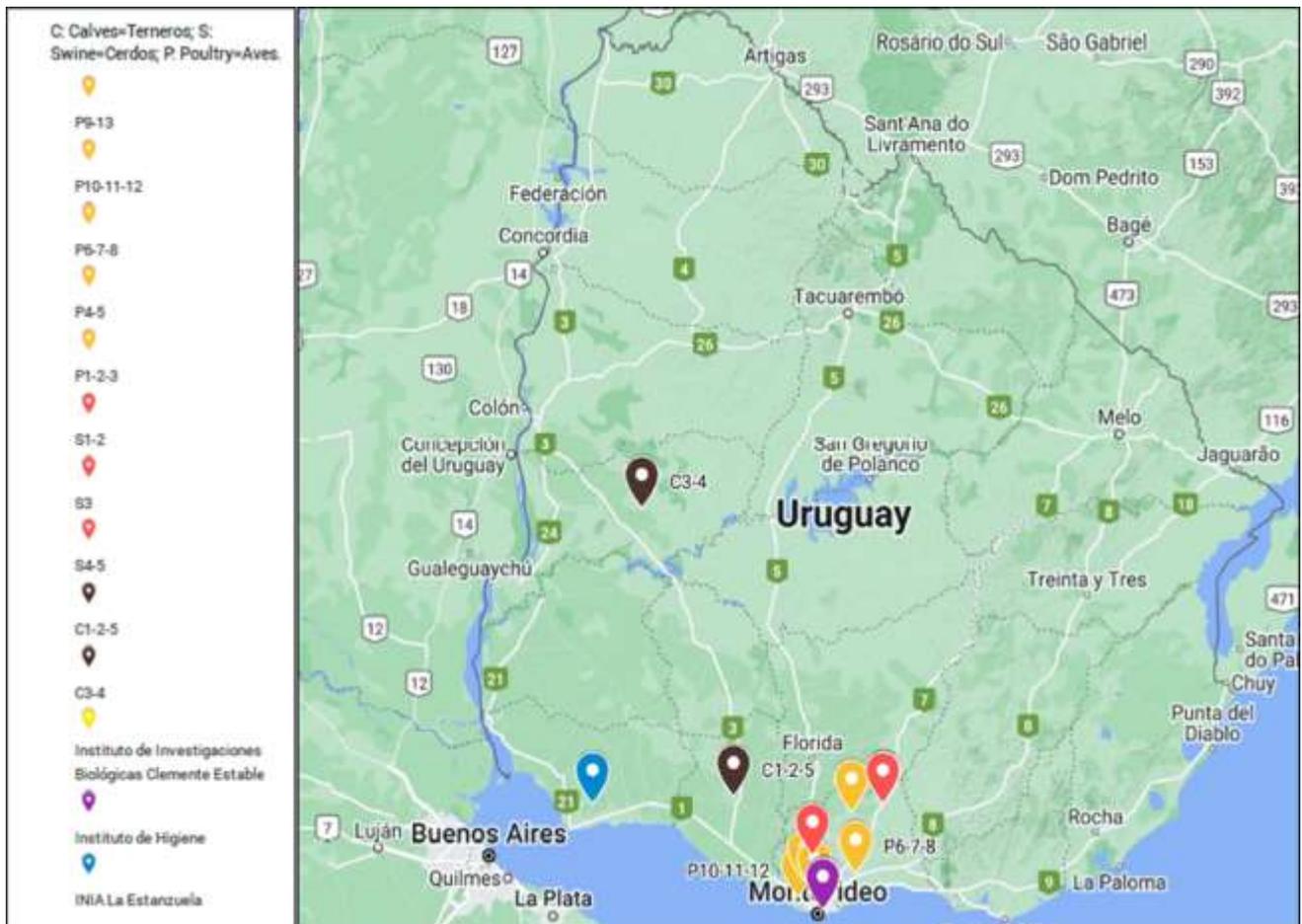


Figura 6 Mapa de la distribución geográfica de los establecimientos muestreados. Color amarillo aves, color rojo cerdos y color negro terneros. Link de acceso al mapa: <https://www.google.com/maps/d/u/0/edit?mid=1e8MWJcEjCjpbNrgaQi7-Wx3mvpaGRxPp&usp=sharing>

## 2. Resistencia a antibióticos críticos en terneros de tambo, cerdos y aves en producción de Uruguay

### 2.A Resistencia a antibióticos críticos por establecimiento y especie animal estudiada

Se muestrearon un total de 100 terneros distribuidos en 5 establecimientos, 20 animales en cada uno. En 55 (55%) de las muestras de materia fecal de los terneros se detectó crecimiento de *Escherichia coli* en medios con antimicrobianos críticos. De estos, 54 presentaron crecimiento en presencia de ciprofloxacina, mientras que uno mostró resistencia adicional a ceftriaxona. No se observó crecimiento en medio con colistina. A su vez, 45 terneros (45%) no presentaron crecimiento en los medios con antibióticos.

Al desglosar los resultados por establecimiento, se observó que en el Establecimiento 1 (E1), 8 de 20 terneros presentaron aislamientos resistentes, en el Establecimiento 2 (E2) fueron 5 de 20, en el Establecimiento 3 (E3) fueron 16 de 20 terneros, en el Establecimiento 4 (E4) 7 de 20 presentaron crecimiento, y en el Establecimiento 5 (E5) se observó crecimiento de aislamientos resistentes en 19 de 20 terneros (Fig. 7).

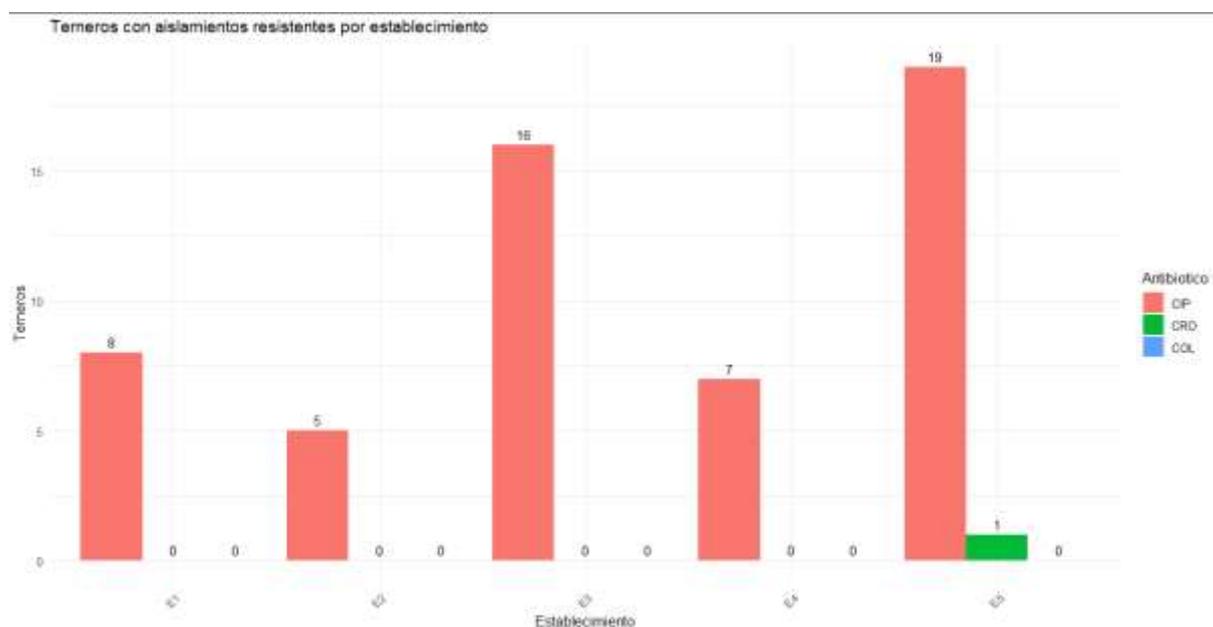


Figura 7 Se muestran los cinco establecimientos (tambos) en relación al número de animales (terneros) que presentaron aislamientos resistentes, para cada antibiótico testeado

Dado que se observaron diferencias entre los establecimientos en relación a la recuperación de aislamientos resistentes a ciprofloxacina, se procedió a agruparlos en dos (grupo 1: compuesto por los establecimientos E1, E2, E4 que presentaban

menos del 50% de animales colonizados y grupo 2: compuesto por los establecimientos E3 y E5 que presentaba más del 50% de animales colonizados). La detección de animales portadores de *E. coli* resistente a fluoroquinolonas a partir de muestras rectales, fue significativamente menor en el grupo 1  $p < 0.001$  ( $\chi^2 = 26.305$ ) ver Figura 8.

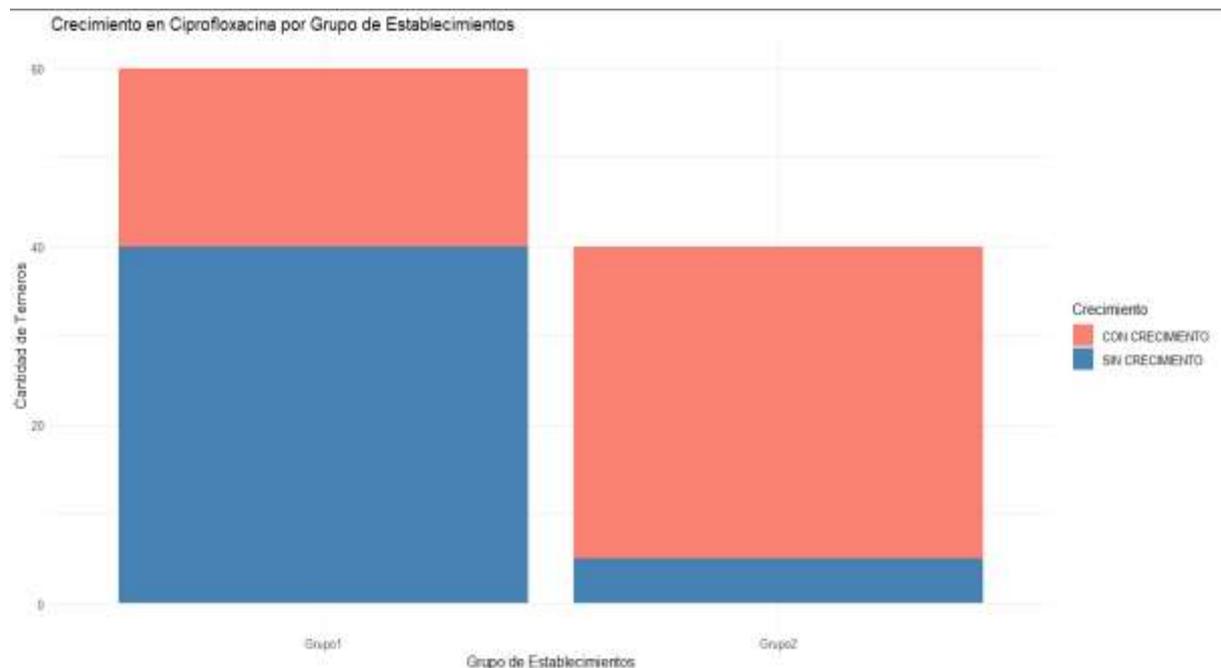


Figura 8 Diferencias en el crecimiento de *E. coli* en ciprofloxacina en terneros entre los dos grupos de establecimientos Grupo 1: E1, E2, E4. vs Grupo 2: E3 y E5.

En aves de producción, se muestrearon 132 animales provenientes de 13 establecimientos (con un promedio de 10 aves por establecimiento). De estas, se observó crecimiento de *E. coli* en medios con ciprofloxacina, ceftriaxona y/o colistina en 117 aves, lo que representa el 89% del total. En contraste, 15 aves (11%) no presentaron crecimiento en los medios con antibióticos. Como se muestra en la figura 9, en todos los establecimientos se detectaron aislamientos resistentes a al menos uno de los antimicrobianos analizados. De las 117 aves, se obtuvieron y analizaron 140 aislamientos de *E. coli* para evaluar su perfil de resistencia y genes de RAM (Fig. 9).

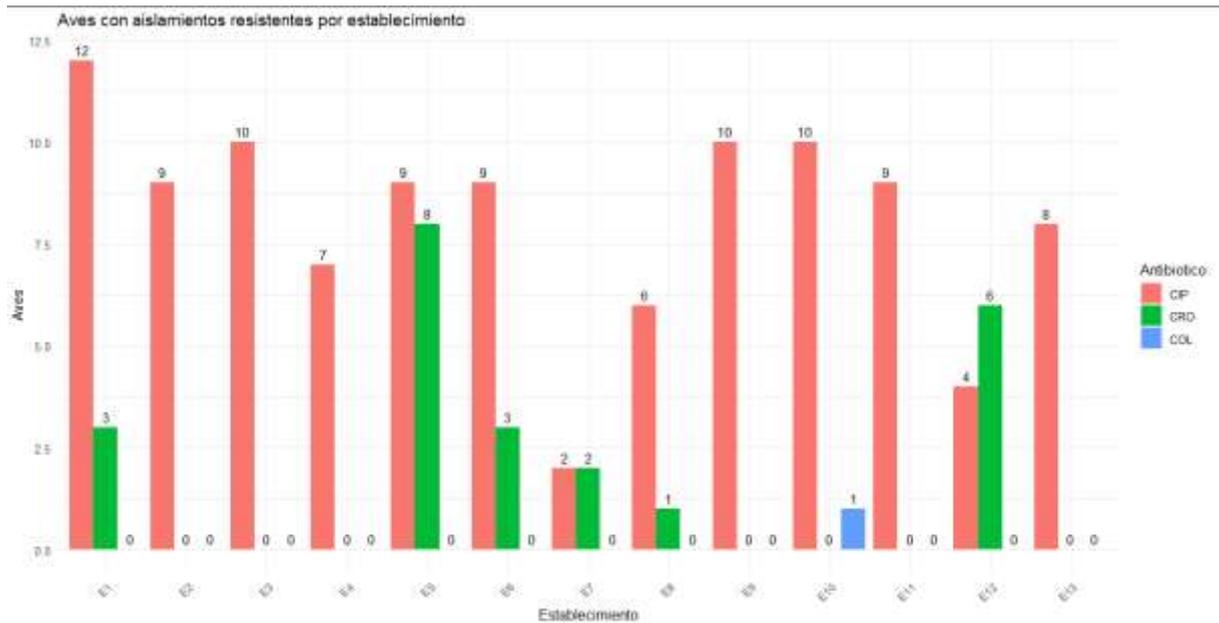


Figura 9. Aves por establecimiento con aislamiento de *E. coli* resistente a al menos uno de los antimicrobianos críticos evaluados.

En cuanto a los cerdos, se muestrearon 50 animales (10 por establecimiento) de 5 establecimientos en total. En 47 cerdos (94% del total) se detectó crecimiento de *E. coli* en medios con ciprofloxacina, ceftriaxona y/o colistina. Solo 3 animales (6%) no presentaron crecimiento. Al igual que en los terneros y aves, en todos los establecimientos se identificaron aislamientos resistentes a al menos uno de los antimicrobianos estudiados. De los 47 cerdos con crecimiento de *E. coli*, se analizaron un total de 99 aislamientos (Fig. 10).

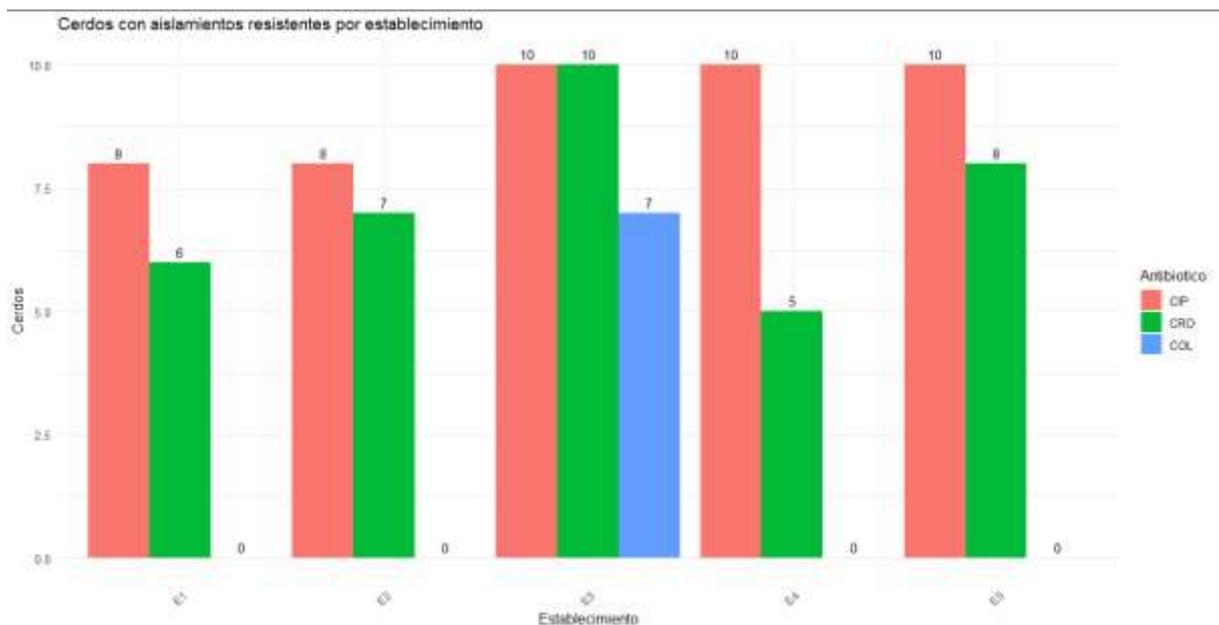


Figura 10 Cerdos por establecimiento que presentaron crecimiento de *E. coli* en presencia de alguno de los antibióticos críticos estudiados.

Resumiendo, se observó el crecimiento de *E. coli* resistentes a antibióticos críticos (ciprofloxacina, ceftriaxona y/o colistina) en las tres especies animales estudiadas: terneros, aves y cerdos. En terneros, el 55% presentaron aislamientos resistentes a al menos uno de los antibióticos evaluados, mientras que en aves esta proporción alcanzó el 89% y en cerdos, el 94% (Tabla 4).

Tabla 4 Animales estudiados por especie que presentaron aislamientos de *E. coli* resistentes a al menos un antibiótico crítico testeado

Especie animal	Animales con aislamientos resistentes a al menos un antibiótico crítico		
	SI	NO	Total, de animales
Terneros	55 (55%)	45 (45%)	100
Aves	117 (89%)	15 (11%)	132
Cerdos	47 (94%)	3 (6%)	50
Total, de animales	219	63	282

## 2.B Animales con aislamientos de *E. coli* resistentes a ciprofloxacina, ceftriaxona y/o colistina por especie animal

Como se mencionó anteriormente en este trabajo se evaluó la presencia de *E. coli* resistentes a tres antibióticos críticos: Ciprofloxacina, Ceftriaxona y Colistina, en tres especies animales: bovinos (terneros), aves y cerdos. Los resultados mostraron que el 55% de los terneros presentaron aislamientos resistentes a Ciprofloxacina (55 de 100), el 79.5 % (105 de 132) de las aves y el 92 % (46 de 50) de los cerdos observándose animales con aislamientos de *E. coli* resistentes en todos los establecimientos estudiados (tabla 5). En cuanto a Ceftriaxona, el 1% (1 de 100) de los terneros, el 17.4% (23 de 132) de las aves y un 72 % (36 de 50) de los cerdos mostraron aislamientos resistentes. Respecto a Colistina, no se registraron aislamientos resistentes en terneros (0 de 100), mientras que las aves presentaron un 0.76% (1 de 132) y los cerdos un 14% (7 de 50).

Al comparar el análisis de la presencia de aislamientos resistentes a antibióticos críticos entre las diferentes especies animales (terneros, aves y cerdos) revela patrones significativos (Tabla 5). Para la ciprofloxacina, se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) al comparar terneros contra cerdos y aves, destacando una mayor proporción de aislamientos resistentes en cerdos 92% y aves 79.5% en comparación con terneros 55%. En el análisis entre aves y cerdos, no se encontró una diferencia significativa ( $p = 0.076$ ), aunque se observó una tendencia. En cuanto a la ceftriaxona, se encontró una diferencia significativa entre cerdos con respecto a terneros y aves ( $p < 0.001$ ), y a la vez también entre aves con respecto a terneros ( $p < 0.001$ ) (Tabla 5).

En relación a la colistina, no se observó una diferencia significativa entre terneros y aves ( $p = 1$ ), sin embargo, se identificó una diferencia significativa entre cerdos contra terneros y aves ( $p < 0.001$ ) (Tabla 5).

Se evidenció una variabilidad en la resistencia a los antibióticos críticos entre las especies estudiadas. En comparación con los terneros, las aves demostraron una proporción más elevada de resistencia a la ciprofloxacina y ceftriaxona, mientras que los cerdos presentaron proporción más elevada de resistencia a ciprofloxacina, ceftriaxona y colistina. Por su parte los cerdos portaron significativamente más aislamientos resistentes a ceftriaxona y colistina que las aves.

*Tabla 5 Comparación entre las especies animales terneros, aves y cerdos vs aislamientos resistentes a Ciprofloxacina, Ceftriaxona y/o Colistina*

Antibióticos críticos	Comparación Especie animal	Resistentes (Especie 1)	No Resistentes (Especie 1)	Resistentes (Especie 2)	No Resistentes (Especie 2)	X-squared	p. valor
Ciprofloxacina	Terneros vs aves	55	45	105	27	14.89	< 0,001
	Aves vs cerdos	105	27	46	4	3.15	0.076
	Terneros vs Cerdos	55	45	46	4	19.1	< 0,001
Ceftriaxona	Terneros vs aves	1	99	23	109	<b>14.83</b>	< 0,001
	Aves vs cerdos	23	109	36	14	46.84	< 0,001
	Terneros vs Cerdos	1	99	36	14	86.65	< 0,001
Colistina	Terneros vs aves	0	100	1	131	<1	1
	Aves vs cerdos	1	131	7	43	12.15	< 0,001
	Terneros vs Cerdos	0	100	1	43	11.71	< 0,001

## 2.C Estudio de susceptibilidad antibiótica en los aislamientos de *E. coli* trabajados por especie animal.

Se trabajó con 73 aislamientos de *E. coli* obtenidos de 55 terneros, lo que indica que, de los 100 terneros muestreados, 55 presentaron *E. coli* resistente. Sin embargo, el número total de aislamientos fue mayor (73) porque en algunos terneros se recuperaron más de una cepa de *E. coli* con diferente perfil de resistencia.

En el caso de aves, se obtuvieron 140 aislamientos de 117 aves, lo que significa que, de las 132 aves muestreadas, 117 presentaron *E. coli* resistente. Al igual que en los terneros, algunas aves presentaron más de un aislamiento con diferente perfil de resistencia, lo que explica que el número total de aislamientos (140) sea mayor que el número de aves con aislamientos resistentes (117).

Para cerdos, se trabajó con 99 aislamientos obtenidos de 47 cerdos, lo que indica que, de los 55 cerdos muestreados, 47 presentaron *E. coli* resistente. Al igual que en los otros grupos, algunos cerdos presentaron más de un aislamiento con diferentes características fenotípicas, lo que explica que se hayan recuperado 99 aislamientos en total.

En resumen, el número total de aislamientos es mayor que el número de animales positivos porque, en muchos casos, un mismo animal albergaba múltiples aislamientos con diferentes características de resistencia.

Las variaciones en la susceptibilidad a antimicrobianos al comparar las especies se muestran en la tabla 6. Para AMC, los aislamientos resistentes fueron mayores en cerdos (55.6%) en comparación con terneros (1.4%) y aves (12.9%), con valores de  $p < 0.05$  en todas las comparaciones que involucran a cerdos. En CAZ, la proporción de aislamientos resistentes fue 0% en terneros y 23.2% en cerdos, siendo esta diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, en los aislamientos de aves se observó una resistencia del 7.9%. Además, tanto la comparación entre aves y cerdos como la de terneros y aves resultaron ser significativamente diferentes (Tabla 6).

Para CRO, la proporción de aislamientos resistentes fue similar a CAZ, con terneros en 1.4% y cerdos en 45.5%, y diferencias significativas entre todas las especies, lo cual indica una distribución diferencial de la resistencia. En cuanto a CIP, la resistencia fue elevada en los aislamientos de todas las especies estudiadas (>92%),

destacándose los provenientes de terneros, con un 100% de resistencia. Además, no se detectaron diferencias significativas entre terneros y cerdos, lo que sugiere una distribución homogénea de la resistencia a CIP en las poblaciones analizadas (Tabla 6).

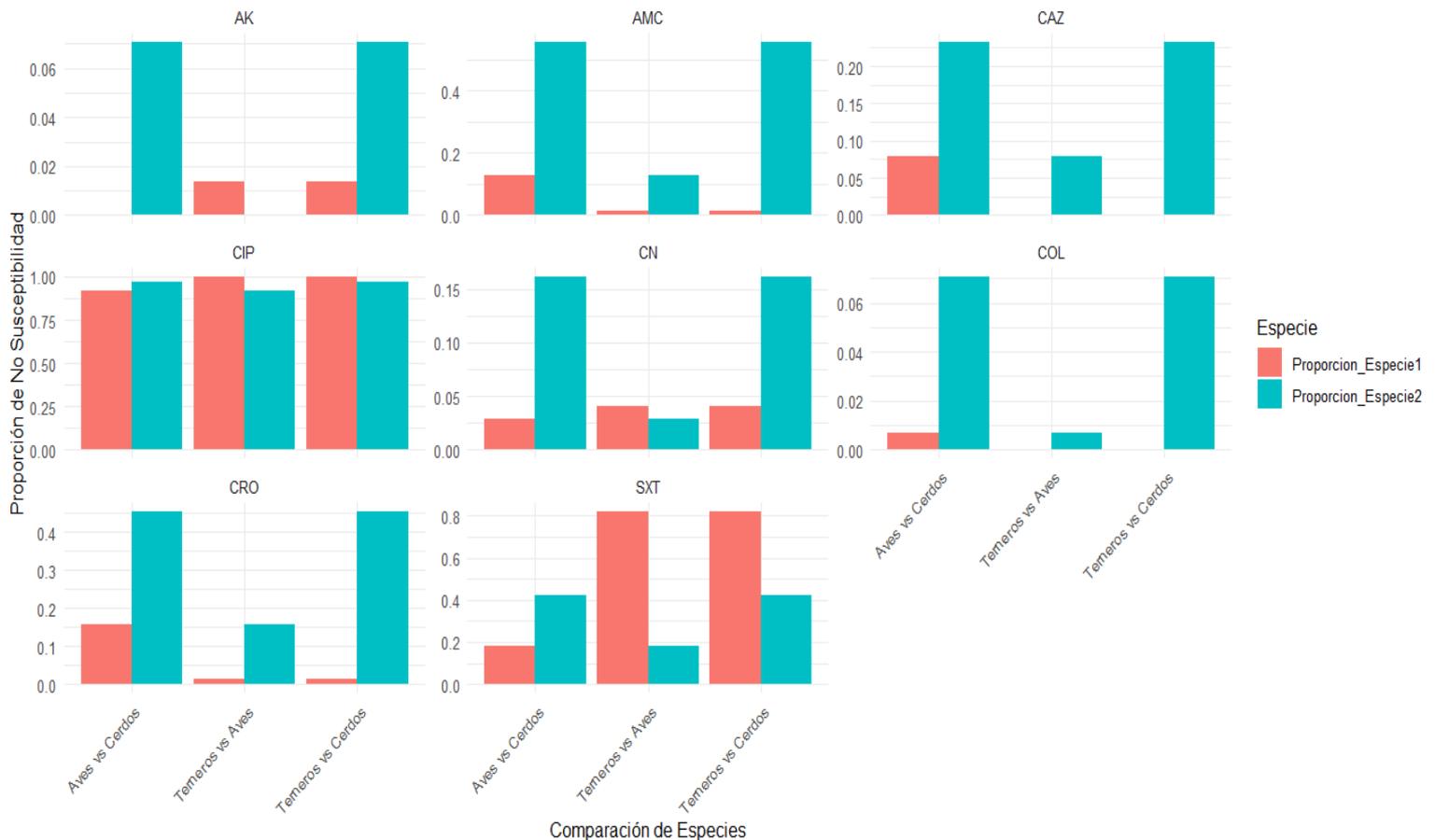
Con respecto a CN, la proporción de aislamientos resistentes fue < 5% en terneros y aves, alcanzando 16.2% en cerdos, con diferencias significativas entre cerdos y las otras dos especies. En AK, la proporción de resistentes fue inferior al 7.1% en todas las especies, aunque la comparación entre aves y cerdos resultó significativa. Para SXT, los resistentes representaron 82.2% en terneros, 42.4% en cerdos y 17.9% en aves, con comparaciones significativas entre todas las especies. Finalmente, para COL, la resistencia fue prácticamente inexistente en terneros y aves, mientras que en cerdos fue de 7.1% (Tabla 6). Se evidencio que los cerdos presentan proporciones elevadas de aislamientos resistentes a los antibióticos evaluados (AMC, CAZ, CRO, CN, SXT). Terneros y aves muestran, en general, menores proporciones de aislamientos resistentes salvo en el caso de CIP y SXT en terneros (Fig. 11).

*Tabla 6 Resultados por cada antibiótico, mostrando la proporción de aislamientos no susceptibles (%), comparación entre especies estudiadas, el valor del estadístico X<sup>2</sup> y el p-valor*

Antibióticos testados	Comparación Especie animal	Proporción de Resistentes (Especie 1) (%)	Proporción de Resistentes (Especie 2) (%)	X-cuadrado	p. valor
AMC	Terneros vs aves	1 / 73 = 0.0137 (1.37%)	18 / 140 = 0.1286 (12.86%)	6.4433	0.011
	Terneros vs Cerdos	1 / 73 = 0.0137 (1.37%)	55 / 99 = 0.5556 (55.56%)	53.7430	<0.001
	Aves vs cerdos	18 / 140 = 0.1286 (13%)	55 / 99 = 0.5556 (55.56%)	47.8448	<0.001
CAZ	Terneros vs aves	0 / 73 = 0.00 (0%)	11 / 140 = 0.0786 (7.86%)	4.5502	0.0329
	Terneros vs Cerdos	0 / 73 = 0.00 (0%)	23 / 99 = 0.2323 (23.23%)	17.6233	<0.001
	Aves vs cerdos	11 / 140 = 0.0786 (7.86%)	23 / 99 = 0.2323 (23.23%)	10.0102	0.0016
CRO	Terneros vs aves	1 / 73 = 0.0137 (1.37%)	22 / 140 = 0.1571 (15.71%)	8.8147	0.0029
	Terneros vs Cerdos	1 / 73 = 0.0137 (1.37%)	45 / 99 = 0.4545 (45.45%)	39.4608	<0.001
	Aves vs cerdos	22 / 140 = 0.1571 (15.71%)	45 / 99 = 0.4545 (45.45%)	23.9714	<0.001
CIP	Terneros vs aves	73 / 73 = 1.0000 (100%)	129 / 140 = 0.9214 (92.14%)	4.5502	0.0329
	Terneros vs Cerdos	73 / 73 = 1.0000 (100%)	96 / 99 = 0.9697 (96.97%)	0.8304	0.3622

	Aves vs cerdos	129 / 140 = 0.9214 (92.14%)	96 / 99 = 0.9697 (96.97%)	1.6529	0.1986
CN	Terneros vs aves	3 / 73 = 0.0411 (4%)	4 / 140 = 0.0286 (2.86%)	0.0067	0.9349
	Terneros vs Cerdos	3 / 73 = 0.0411 (4.11%)	16 / 99 = 0.1616 (16.6%)	5.0450	0.0247
	Aves vs cerdos	4 / 140 = 0.0286 (2.86%)	16 / 99 = 0.1616 (16.16%)	11.7081	0.0006
AK	Terneros vs aves	1 / 73 = 0.0137 (1.37%)	0 / 140 = 0.00 (0%)	0.1103	0.7398
	Terneros vs Cerdos	1 / 73 = 0.0137 (1.37%)	7 / 99 = 0.0707 (7.07%)	1.9278	0.1649
	Aves vs cerdos	0 / 140 = 0.00 (0%)	7 / 99 = 0.0707 (7.07%)	7.8623	0.0050
SXT	Terneros vs aves	60 / 73 = 0.8219 (82.19%)	25 / 140 = 0.1786 (17.86%)	80.1506	<0.001
	Terneros vs Cerdos	60 / 73 = 0.8219 (82.19%)	42 / 99 = 0.4242 (42.42%)	25.9094	<0.001
	Aves vs cerdos	25 / 140 = 0.1786 (17.86%)	42 / 99 = 0.4242 (42.42%)	16.1523	<0.001
COL	Terneros vs aves	0 / 73 = 0.00 (0%)	1 / 140 = 0.0071 (0.71%)	<1	1.0000
	Terneros vs Cerdos	0 / 73 = 0.00 (0%)	7 / 99 = 0.0707 (7.07%)	3.7219	0.0537
	Aves vs cerdos	1 / 140 = 0.0071 (0.71%)	7 / 99 = 0.0707 (7.07%)	5.4109	0.0200

Nomenclatura: Amoxicilina con Ac. Clavulánico (AMC), Ceftazidime (CAZ), Ceftriaxona (CRO), Ciprofloxacina (CIP), Gentamicina (CN), Amikacina (AK), Trimetropin sulfametoxazol (SXT), Colistina (COL). Resistentes (halo intermedio más resistentes)



*Figura 11 Proporción de resistentes a antibióticos testados por especie animal estudiada*

Amoxicilina con Ac. Clavulánico (AMC), Ceftazidime (CAZ), Ceftriaxona (CRO), Ciprofloxacina (CIP), Gentamicina (CN), Amikacina (AK), Trimetropin sulfametoxazol (SXT), Colistina (COL). Resistente: intermedios + resistentes.

## **2.D Interpretación de resultados de la susceptibilidad a gentamicina CLSI 2021 vs CLSI 2024**

En 2024, el CLSI actualizó los puntos de corte para la gentamicina. Los nuevos criterios definen sensibilidad con un valor  $\geq 18$  mm, resistencia con un valor  $\leq 14$  mm, y un rango intermedio entre 15 y 17 mm. Estos puntos difieren con los establecidos por el CLSI 2021, donde la sensibilidad se establecía en  $\geq 15$  mm, el rango intermedio entre 13 y 14 mm, y la resistencia en  $\leq 12$  mm. Por este motivo, se realizó la comparación de la interpretación de los resultados de la susceptibilidad a gentamicina según las guías CLSI 2021 y CLSI 2024 para evaluar las variaciones en las proporciones de aislamientos resistentes en terneros, aves y cerdos. Si bien esta comparación tiene que ver con cambios de criterios de interpretación más que con aumentos de la resistencia en sí, es interesante analizar qué proporción de bacterias en la población estudiada se encuentran agrupadas en la ventana de variación de interpretación. Son estos microorganismos los que podrían asociarse más a eventuales fallos terapéuticos y a cambios en la toma de decisiones terapéuticas y en el manejo clínico de las infecciones bacterianas.

De la comparación de los resultados discriminados por especie surge que, en terneros, la proporción de aislamientos resistentes a gentamicina pasó del 4% al 12%, en aves, del 3% al 14% y en cerdos del 15% al 30%.

A nivel global, la proporción de aislamientos resistentes a gentamicina pasó del 7% al 19% de acuerdo a los nuevos criterios de CLSI (ver Tabla 7). Lo que implica un cambio de resultado en 36 aislamientos.

Tabla 7 Comparación entre la interpretación de resultados de la susceptibilidad a gentamicina por la CLSI 2021 vs CLSI 2024 por aislamiento y por especie estudiada

Especie animal	Total, de resistentes a CN CLSI 2021	Total, de susceptibles a CN CLSI 2021	Proporción de aislamientos resistentes CLSI 2021	Total, de resistentes a CN CLSI 2024	Total, de susceptibles a CN CLSI 2024	Proporción de aislamientos resistentes CLSI 2024
Terneros	3	70	4%	9	64	12%
Aves	5	135	3%	20	120	14%
Cerdos	15	84	15%	30	69	30%
Total	23	289	7%	59	253	19%

## 2.E Perfiles de resistencia a antimicrobianos obtenidos en el estudio

Si bien se estudió específicamente la presencia de microorganismos resistentes a tres antimicrobianos críticos para humanos, el análisis de susceptibilidad reveló que las misma muchas veces se acompañaba de resistencia a otras clases de antimicrobianos.

A continuación, se describirán los diferentes perfiles de resistencia más predominantes detectados de acuerdo a la especie estudiada.

Los 73 aislamientos obtenidos de terneros resistentes a ciprofloxacina se dividieron en 6 perfiles diferentes, de los cuales el 92% (67/73) se concentraron en dos perfiles: resistentes solo a un antibiótico (CIP): 12, y resistentes a dos antibióticos (CIP y SXT): 55. Los restantes 4 perfiles fueron: resistentes a CIP y CRO: 1, resistentes a tres antibióticos (CIP, SXT y CN): 3; a (CIP, SXT y AK): 1 y a (CIP, AMC y SXT): 1 estos últimos tres perfiles fueron clasificados como multidrogo resistentes (MDR), es decir, resistentes a tres o más familias de antibióticos, donde se incluyen un total de 5 aislamientos, lo que representa el 6.85% del total ver tablas 8 y 9.

Para el caso de las aves, de los 140 aislamientos estudiados se evidenciaron 16 perfiles de resistencia diferentes dentro de los cuales el 82% se concentraron en dos perfiles: resistentes a un solo antibiótico (CIP): 93 y resistentes a dos antibióticos (CIP y SXT): 22. Se destacan también el perfil de resistencia a 3 antibióticos (AMC, CRO y CIP) en 3 y a cuatro (AMC, CRO, CAZ y CIP) en 4. En total 7 perfiles fueron considerados como MDR lo que representa 12 aislamientos (8.57%). Todos los perfiles pueden verse en las tablas 8 y 9.

Finalmente, de los 99 aislamientos estudiados de cerdos, se evidenció un total de 28 perfiles de resistencia, de los cuales 22 correspondieron a aislamientos MDR y representaron el 56% de los aislamientos. A diferencia de lo señalado para bovinos y aves, la distribución de los aislamientos fue más heterogénea entre los distintos perfiles (ver tablas 8 y 9).

Tabla 8 Perfiles de no susceptibilidad (resistentes) por especie animal estudiada (terneros, aves y cerdos).

Especies	Perfil (aislamientos)	AMC	CAZ	CRO	CIP	CN	AK	SXT	COL
Terneros 73 <i>E. coli</i>	1 (55)								
	2 (12)								
	3 (3)								
	4 (1)								
	5 (1)								
	6 (1)								
Total	6 (73)	1	0	1	73	3	1	60	0
Aves 140 <i>E. coli</i>	1 (93)								
	2 (22)								
	3 (5)								
	4 (4)								
	5 (3)								
	6 (3)								
	7 (1)								
	8 (1)								
	9 (2)								
	10 (1)								
	11 (1)								
	12 (1)								

Especies	Perfil (aislamientos)	AMC	CAZ	CRO	CIP	CN	AK	SXT	COL
	13 (1)								
	14 (1)								
	15 (1)								
	16 (1)								
Total	16 (140)	18	11	22	129	4	0	25	1
Cerdos 99 <i>E. coli</i>	1 (24)								
	2 (12)								
	3 (7)								
	4 (7)								
	5 (6)								
	6 (5)								
	7 (4)								
	8 (4)								
	9 (4)								
	10 (3)								
	11 (2)								
	12 (2)								
	13 (2)								
	14 (2)								
	15 (2)								
	16 (1)								
	17 (1)								
	18 (1)								
	19 (1)								
	20 (1)								
	21 (1)								
	22 (1)								
	23 (1)								
	24 (1)								
	25 (1)								
	26 (1)								
	27 (1)								
	28 (1)								
Total	28 (99)	55	23	45	96	16	7	42	7

Nomenclatura: amoxicilina/ácido clavulánico (AMC), ceftazidima (CAZ), ceftriaxona (CRO), ciprofloxacina (CIP), gentamicina (CN), amikacina (AK), trimetoprima/sulfametoxazol (SXT) y colistina (COL). Las celdas sombreadas en amarillo indican resistencia a ese antibiótico en particular para el o los aislamiento/s.

Sintetizando los resultados obtenidos de los aislamientos MDR, de un total de 312 aislamientos de terneros, aves y cerdos, 73 fueron clasificados como MDR, es decir, resistentes a tres o más familias de antibióticos. La distribución de estos aislamientos por especie animal mostró que los terneros presentaron 5 aislamientos, lo que representa el 6.8 % del total, mientras que las aves aportaron 12 aislamientos (8.6%), y los cerdos 56 aislamientos (56.6%). La cadena porcina no solo presenta una elevada proporción de aislamientos resistentes a los antibióticos críticos para los humanos, sino que también acumulan una elevada cantidad de microorganismos MDR (ver Figura 12).

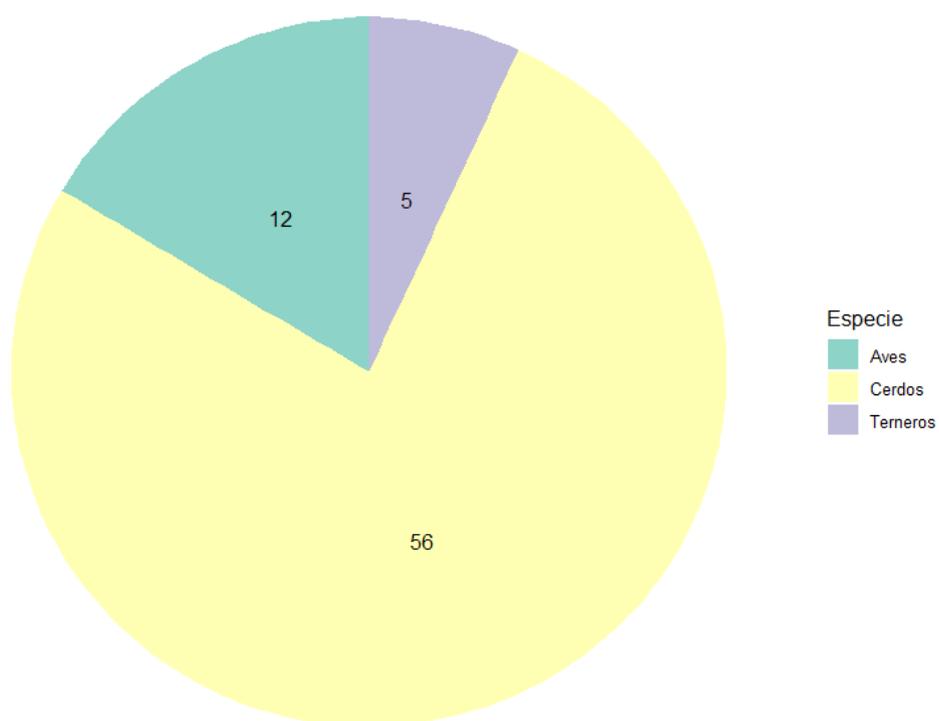


Figura 12 Aislamientos de *E. coli* multidrogo resistentes (MDR) por especie animal estudiada

Los perfiles MDR de este trabajo ya fueron descritos y se muestran en la Tabla 9, evidenciando que en terneros un total de 3 perfiles MDR, en aves 7 y en cerdos 22.

Tabla 9 Perfiles de no susceptibilidad (resistentes) de los aislamientos multidrogo resistentes obtenidos de muestras de terneros, aves y cerdos.

Especies	Perfil (aislamientos)	AMC	CAZ	CRO	CIP	CN	AK	SXT	COL
Terneros 73 <i>E. coli</i>	1 (3)								
	2 (1)								
	3 (1)								
Total	3 (5)	1	0	0	5	3	1	5	0
Aves 140 <i>E. coli</i>	1 (4)								
	2 (3)								
	3 (1)								
	4 (1)								
	5 (1)								
	6 (1)								
	7 (1)								

Total	7 (12)	11	6	11	10	3	0	2	0
Cerdos 99 <i>E. coli</i>	1 (12)								
	2 (6)								
	3 (5)								
	4 (4)								
	5 (4)								
	6 (4)								
	7 (3)								
	8 (2)								
	9 (2)								
	10 (2)								
	11 (1)								
	12 (1)								
	13 (1)								
	14 (1)								
	15 (1)								
	16 (1)								
	17 (1)								
	18 (1)								
	19 (1)								
	20 (1)								
	21 (1)								
	22 (1)								
Total	22 (56)	47	23	40	56	16	7	35	7

Nomenclatura: amoxicilina/ácido clavulánico (AMC), ceftazidima (CAZ), ceftriaxona (CRO), ciprofloxacina (CIP), gentamicina (CN), amikacina (AK), trimetoprima/sulfametoxazol (SXT) y colistina (COL). Las celdas sombreadas en amarillo indican resistencia a ese antibiótico en particular para el o los aislamiento/s.

## 2.F Genes de resistencia transferibles encontrados en el estudio

El estudio de genes de resistencia transferibles a los antibióticos críticos estudiados en *E. coli* aisladas de diferentes especies animales, mostró diferencias significativas en la proporción de genes de resistencia. Entre los 73 aislamientos de *E. coli* de terneros, el 30.1% presentaba genes de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (PMQR), con predominancia del gen *qnrB19*. La presencia de genes BLEE/AmpC fue baja, con solo el 1.4% mostrado por el gen *bla<sub>CTX-M-15</sub>*, y no se detectó el gen *mcr-1*. En contraste, en los 140 aislamientos de *E. coli* provenientes de aves, el 44.3% mostró resistencia PMQR, principalmente *qnrB19*, y el 16.4% presentó genes BLEE/AmpC, incluyendo *bla<sub>CTX-M-2</sub>*, *bla<sub>CTX-M-8</sub>*, *bla<sub>CTX-M-55</sub>*, y *bla<sub>CMY-2</sub>*. El gen *mcr-1* fue

encontrado solo en el 0.7% de los aislamientos. Finalmente, en los 99 aislamientos de *E. coli* de cerdos, se encontró una alta proporción de genes BLEE/AmpC 40.4%, evidenciada por la presencia de genes *bla*<sub>CTX-M-8</sub> y *bla*<sub>CMY-2</sub>. Los genes PMQR estuvieron presentes en el 38.4% de los aislamientos, y el gen *mcr-1* se observó en el 7.1% ver Tabla 10.

Tabla 10 Proporciones de genes de resistencia a antibióticos en *E. coli* aisladas de diferentes especies animales estudiadas

Especie animal	Número total de aislamientos	<i>bla</i> (BLEE/AmpC)	PMQR	<i>mcr</i>
Terneros	73	1 (1.4%)	22 (30.1%)	0 (0%)
Aves	140	23 (16.4%)	62 (44.3%)	1 (0.7%)
Cerdos	99	40 (40.4%)	38 (38.4%)	7 (7.1%)
Total	312	64 (20.4%)	122 (39.1%)	8 (2.6%)

*bla* (BLEE/pAmpC): *bla*:  $\beta$ -lactamasa. BLEE:  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido. AmpC:  $\beta$ -lactamasa con actividad contra cefalosporinas. PMQR: Mecanismos de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (Plasmid-mediated Quinolone Resistance). *mcr-1*: Un gen que codifica una enzima de resistencia a colistina

### 2.F.1 Genes transferibles de resistencia a antimicrobianos críticos encontrados en los aislamientos de *E. coli* obtenidas de terneros

De los 73 aislamientos de *E. coli* estudiados en terneros se observó que la única BLEE detectada es codificada por el gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, presente en un aislamiento. El gen de resistencia más frecuentemente encontrado fue *qnrB19*, identificado en todos los establecimientos excepto E4, con una cantidad total de 22 aislamientos que contenían este gen. En cuanto a los genotipos, el establecimiento E5 presentó una mayor diversidad, con varios genotipos, incluyendo *bla*<sub>CTX-M-15</sub>/*qnrB19* y otros relacionados con *qnrB19*, *qnrE1* y *qnrS1*. No se detectaron genes de resistencia *mcr* en ninguno de los aislamientos, lo que indica una ausencia de resistencia transferible a colistina en las muestras de terneros estudiadas ver Tabla 11.

Tabla 11 Resultados de los estudios por establecimiento de terneros estudiados

	Establecimientos estudiados	<i>E. coli</i> aisladas en terneros	Genes de resistencia			Genotipos detectados
			<i>bla</i>	PMQR	<i>mcr</i>	
Terneros	E1	11	-	<i>qnrB19</i> (3)	-	<i>qnrB19</i> (3)
	E2	6	-	<i>qnrB19</i> (2)	-	<i>qnrB19</i> (2)
	E3	20	-	<i>qnrB19</i> (6)	-	<i>qnrB19</i> (6)
	E4	7	-	-	-	-
	E5	29	CTX-M-15 (1)	<i>qnrB19</i> (8), <i>qnrE1</i> (2), <i>qnrS1</i> (1)	-	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> / <i>qnrB19</i> (1), <i>qnrB19</i> (7), <i>qnrE1</i> (2), <i>qnrS1</i> (1)
	Total	73	1	22	0	

E: establecimiento. PMQR: Mecanismos de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (Plasmid-mediated Quinolone Resistance).

## 2.F.2 Genes transferibles de resistencia a antimicrobianos críticos encontrados en los aislamientos de *E. coli* obtenidas de aves

El estudio de la presencia de genes de resistencia en los 140 aislamientos de *E. coli* obtenidos de aves, se observó que 23 aislamientos presentaban genes de resistencia *bla*, siendo el más frecuente *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, seguido por *bla*<sub>CTX-M-8</sub>, *bla*<sub>CTX-M-55</sub> y *bla*<sub>CMY-2</sub>. Además, el gen *qnrB19* fue hallado en 62 aislamientos y el gen de resistencia a polimixinas se observó en un aislamiento con el gen *mcr-1* (ver Tabla 12).

En cuanto a los genotipos, los establecimientos E1, E2, E6 y E13 presentaron una mayor diversidad, con varios genotipos, incluyendo *bla*<sub>CTX-M-2</sub>/*qnrE1* en el E1, *bla*<sub>CTX-M-2</sub>/*qnrB19* en el E2, *mcr-1*/*qnrB19* en el E6, *bla*<sub>CMY-2</sub>/*qnrB19* en E13 y otros relacionados con genes *bla*, *qnrB19*, *qnrE1* y *qnrS1* (ver Tabla 12).

Tabla 12 Resultados de los estudios por establecimiento de aves estudiados

	Establecimientos estudiados	<i>E. coli</i> aisladas	Genes de resistencia			Genotipos detectados
			<i>bla</i>	PMQR	<i>mcr</i>	
Aves	E1	16	CTX-M-2(3)	<i>qnrB19</i> (6), <i>qnrE1</i> (5)	-	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> (2), <i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> / <i>qnrE1</i> (1), <i>qnrE1</i> (2), <i>qnrE1</i> / <i>qnrB19</i> (2), <i>qnrB19</i> (4)
	E2	12	CTX-M-2(3)	<i>qnrB19</i> (4)	-	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> (2), <i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> / <i>qnrB19</i> (1), <i>qnrB19</i> (3)
	E3	3	CTX-M-8(1), CTX-M-55(1)	<i>qnrB19</i> (2)	-	<i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub> (1), <i>qnrB19</i> (1) <i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub> / <i>qnrB19</i> (1)
	E4	10	CMY-2(1)	<i>qnrB19</i> (8)	-	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> (1), <i>qnrB19</i> (8)
	E5	11	-	<i>qnrB19</i> (8)	-	<i>qnrB19</i> (8)
	E6	11	-	<i>qnrB19</i> (1)	<i>mcr-1</i> (1)	<i>qnrB19</i> / <i>mcr-1</i> (1)

E7	15	-	<i>qnrB19</i> (9)	-	<i>qnrB19</i> (9)
E8	9	CMY-2(5), CTX-M-2(1)	<i>qnrB19</i> (1)	-	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> (5), <i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> (1), <i>qnrB19</i> (1)
E9	8	-	<i>qnrB19</i> (4)	-	<i>qnrB19</i> (4)
E10	9	-	-	-	-
E11	10	-	-	-	-
E12	7		<i>qnrB19</i> (3)	-	<i>qnrB19</i> (3)
E13	19	CTX-M-8(3), CMY-2(3), SHV-2a (2)	<i>qnrB19</i> (9), <i>qnrE1</i> (2)	-	<i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub> (3), <i>bla</i> <sub>SHV-2a</sub> (2), <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> (2), <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> / <i>qnrB19</i> (1), <i>qnrB19</i> (7), <i>qnrB19</i> / <i>qnrE1</i> (1), <i>qnrE1</i> (1)
Total	140	23	62	1	

E: establecimiento. PMQR: Mecanismos de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (Plasmid-mediated Quinolone Resistance).

### 2.F.3 Genes transferibles de resistencia a antimicrobianos críticos encontrados en los aislamientos de *E. coli* obtenidas de cerdos

En el estudio de los genes de resistencia en los 99 aislamientos de *E. coli* obtenidas de cerdos, se observó que 40 aislamientos portaban genes de resistencia *bla*, siendo los más frecuente *bla*<sub>CTX-M-8</sub> y *bla*<sub>CMY-2</sub>. En particular, el gen *bla*<sub>CTX-M-8</sub> fue detectado en todos los establecimientos, destacándose en E1 (6 aislamientos) y E5 (7 aislamientos). Además, se observó el gen *qnrB19* en 16 aislamientos y *qnrS1* en 22. En el establecimiento E3, se registró la presencia del gen *mcr-1* en 7 aislamientos. Los genotipos detectados reflejan una complejidad en los mecanismos de resistencia, donde el E2, E3 y E5 presentaron múltiples combinaciones, como *bla*<sub>CTX-M-15</sub>/*qnrB19*/*qnrS1* y *mcr-1*/*bla*<sub>CMY-2</sub> (ver Tabla 13).

Tabla 13 Resultados de los estudios por establecimiento de cerdos estudiados

	Establecimientos	<i>E. coli</i> aisladas	Genes de resistencia			Genotipos detectados
			<i>bla</i>	PMQR	<i>mcr</i>	
Cerdos	E1	17	CTX-M-8(6)	<i>qnrB19</i> (4), <i>qnrS1</i> (1)	-	<i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub> (6), <i>qnrB19</i> (4), <i>qnrB19</i> / <i>qnrS1</i> (1)
	E2	17	CTX-M-8(1), CTX-M-14(3) CTX-M-15(1) CMY-2(2)	<i>qnrB19</i> (8), <i>qnrS1</i> (6)	-	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> / <i>qnrB19</i> / <i>qnrS1</i> (1) <i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub> / <i>qnrB19</i> (1), <i>qnrB19</i> / <i>qnrS1</i> (4), <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> (2), <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> (2), <i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub> (1), <i>qnrB19</i> (2), <i>qnrS1</i> (1)
	E3	26	CMY-2(8) SHV-12(7)	<i>qnrB19</i> (1)	<i>mcr-1</i> (7)	<i>bla</i> <sub>SHV-12</sub> (7), <i>mcr-1</i> (5), <i>mcr-1</i> / <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> (2), <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> (6), <i>qnrB19</i> (1)
	E4	17	CTX-M-8(4), CTX-M-14(1)	<i>qnrS1</i> (8)		<i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub> (4), <i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub> (1), <i>qnrS1</i> (8)

	E5	22	CTX-M-8(7)	<i>qnrB19</i> (3), <i>qnrS1</i> (7)		<i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub> / <i>qnrB19</i> (1), <i>qnrB19/qnrS1</i> (1), <i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub> (7), <i>qnrS1</i> (6)
	Total	99	40	38	7	

E: establecimiento. PMQR: Mecanismos de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (Plasmid-mediated Quinolone Resistance).

## 2.G Ensayos de transferencia de mecanismos de resistencia

Para determinar si los genes de resistencia detectados estaban localizados en plásmidos conjugativos en los aislamientos resistentes a CRO, se llevaron a cabo ensayos de conjugación utilizando como cepa receptora *E. coli* J53-2, resistente a rifampicina. En el caso del aislamiento de *E. coli* resistente a CRO obtenido de terneros, no conjugó. En el caso de las aves, de 23 aislamientos portadores de genes de resistencia *bla*, 19 lograron conjugar exitosamente, y las enzimas transferidas incluyeron CTX-M-2, CTX-M-55, CTX-M-8, SHV-2a y CMY. Además, se observó que CTX-M-55 se transfirió junto con FosA3 (Tabla 14). Para los aislamientos provenientes de cerdos, de los 40 portadores de β-lactamasas, 37 demostraron capacidad de conjugación, transfiriendo enzimas como CTX-M-8, CTX-M-15, CTX-M-14, SHV-12 y CMY-2 (ver Tabla 14).

Tabla 14 Transconjugantes y los mecanismos de resistencia por especie animal

Transconjugantes y mecanismos de resistencia en Aves									
Aislamientos	Antibióticos (halos en mm)							Mecanismos de resistencia	
	AMC	CRO	CAZ	CN	AK	CIP	SXT	Donante	Transconjugante
<i>E. coli</i> RD	23	35	30	30	30	30	34	-	-
TcE A1	16	10	22	25	30	32	30	CTX-M-2/QnrE1	CTX-M-2
TcE A2	17	10	21	22	30	26	30	CTX-M-2	CTX-M-2
TcE A3	15	9	22	25	32	25	30	CTX-M-2	CTX-M-2
TcE A4	16	10	20	25	26	26	32	CTX-M-2/QnrB19	CTX-M-2
TcE A5	20	18	24	26	26	35	30	CTX-M-8	CTX-M-8
TcE A6	6	15	15	24	26	30	32	CTX-M-55/FosA3/QnrB19	CTX-M-55/FosA3
TcE A7	6	17	12	25	23	30	29	CMY-2	CMY-2
TcE A8	6	18	13	25	26	31	32	CMY-2	CMY-2
TcE A9	6	20	18	21	25	32	33	CMY-2	CMY-2
TcE A10	6	18	13	25	26	33	31	CMY-2	CMY-2
TcE A11	6	20	16	24	26	35	35	CMY-2	CMY-2
TcE A12	6	18	15	28	30	30	30	CMY-2	CMY-2
TcE A13	18	16	30	24	25	32	30	CTX-M-8	CTX-M-8

TcE A14	16	17	15	24	25	30	28	CTX-M-8	CTX-M-8
TcE A15	20	12	30	26	25	32	30	SHV-2a	SHV-2a
TcE A16	20	20	26	25	24	30	30	SHV-2a	SHV-2a
TcE A17	6	18	15	21	26	27	25	CMY-2	CMY-2
TcE A18	15	17	25	25	25	30	28	CTX-M-8	CTX-M-8
TcE A19	6	27	20	25	26	30	30	CMY-2	CMY-2
Transconjugantes y mecanismos de resistencia en Cerdos									
TcE C1	18	14	24	22	24	30	32	CTX-M-8	CTX-M-8
TcE C2	20	18	26	22	26	32	30	CTX-M-8	CTX-M-8
TcE C3	18	18	28	30	28	32	30	CTX-M-8	CTX-M-8
5cE C4	16	18	28	26	30	32	40	CTX-M-8	CTX-M-8
TcE C5	20	18	30	26	32	38	36	CTX-M-8	CTX-M-8
TcE C6	22	18	30	30	28	36	38	CTX-M-8	CTX-M-8
TcE C7	12	12	26	10	30	26	6	CTX-M-15/QnrB19/QnsS1	CTX-M-15
TcE C8	6	16	14	14	29	30	6	CMY-2	CMY-2
TcE C9	20	19	28	22	26	32	32	CTX-M-14	CTX-M-14
TcE C10	6	18	15	22	24	30	32	CMY-2	CMY-2
TcE C11	6	17	14	20	25	30	31	CTX-M-14/QnrB19	CTX-M-14
TcE C12	20	14	28	23	26	30	31	CTX-M-8	CTX-M-8
TcE C13	6	18	15	22	24	31	6	CMY-2	CMY-2
TcE C14	6	28	15	25	25	30	6	CMY-2	CMY-2
TcE C15	18	20	16	26	24	24	35	SHV-12	SHV-12
TcE C16	6	20	10	25	25	32	34	CMY-2	CMY-2
TcE C17	6	21	12	26	26	32	34	SHV-12	SHV-12
TcE C18	6	13	14	24	25	30	35	CMY-2	CMY-2
TcE C19	6	16	14	28	30	24	30	SHV-12	SHV-12
TcE C20	6	17	14	22	23	27	26	CMY-2	CMY-2
TcE C21	6	16	15	20	22	30	30	CMY-2	CMY-2
TcE C22	20	22	20	22	25	30	27	SHV-12	SHV-12
TcE C23	20	18	22	24	25	30	30	SHV-12	SHV-12
TcE C24	6	18	20	22	25	24	27	CMY-2	CMY-2
TcE C25	20	20	12	24	26	30	30	SHV-12	SHV-12
TcE C26	16	18	26	28	30	30	30	CTX-M-8	CTX-M-8
TcE C27	20	16	25	25	26	40	35	CTX-M-8	CTX-M-8
TcE C28	15	15	26	22	25	30	34	CTX-M-8	CTX-M-8
TcE C29	15	16	26	20	22	30	30	CTX-M-8	CTX-M-8
TcE C30	24	20	26	29	30	32	30	CTX-M-14	CTX-M-14
TcE C31	16	16	28	28	32	30	32	CTX-M-8	CTX-M-8
TcE C32	17	20	27	25	28	35	35	CTX-M-8	CTX-M-8
TcE C33	18	14	19	22	24	30	30	CTX-M-8	CTX-M-8
TcE C34	17	17	25	25	25	30	35	CTX-M-8	CTX-M-8
TcE C35	18	18	28	24	30	38	32	CTX-M-8	CTX-M-8
TcE C36	18	17	27	23	25	30	32	CTX-M-8	CTX-M-8
TcE C37	18	14	28	24	32	38	34	CTX-M-8	CTX-M-8

A: Aves, C: Cerdos; TcE: Transconjugante de *E. coli*; *E. coli* RD: cepa receptora *E. coli* J53-2 resistente a rifampicina; AMC: Amoxicilina con Acido Clavulánico, CRO: Ceftriaxona; CAZ: Ceftazidime; CN: Gentamicina; AK: Amikacina; CIP: Ciprofloxacina; SXT: Trimetoprim sulfametoxazol.

## 2.G Estudio de plásmidos y pulsotipos en los aislamientos de *E. coli* con el gen *mcr-1* obtenidas de cerdos

Se evidenció que los 7 alelos *mcr-1* estaban codificados en plásmidos conjugativos pertenecientes al grupo de incompatibilidad IncI2. Se observó la circulación de 4

pulsotipos y 4 secuencio-tipos diferentes: el ST3944 según la información actual no parece estar vinculado a un complejo clonal (CC), el ST10 pertenece al CCST10, el ST3322 al CCST86 y el ST184 al CCST184 (Fig. 13).

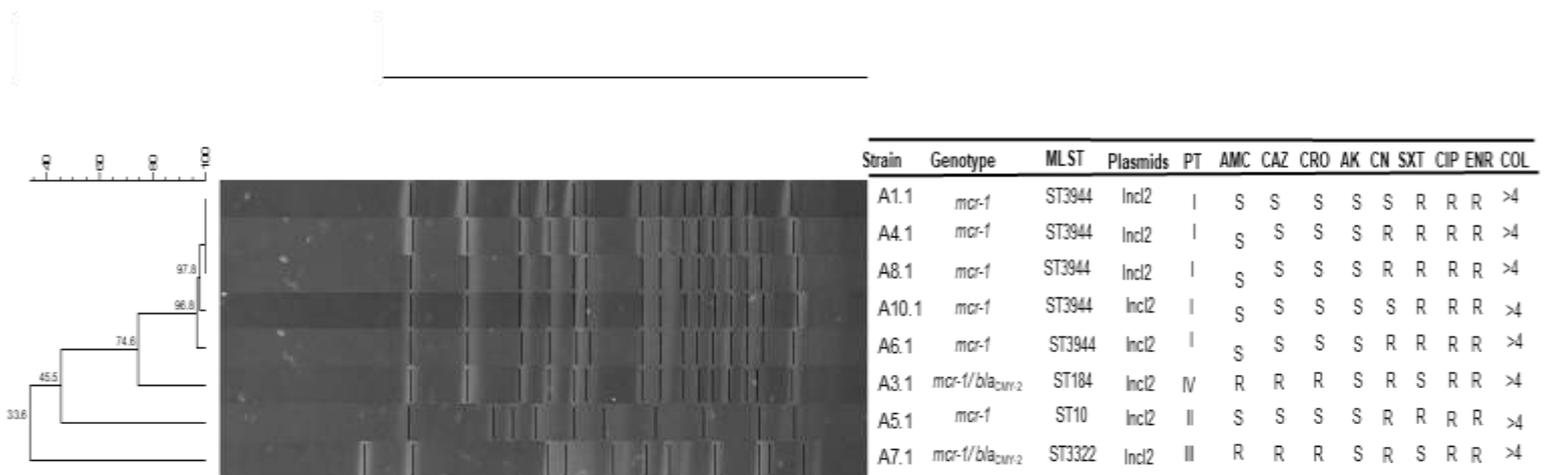


Figura 13 Electroforesis de campo pulsado correspondientes a los aislamientos de *E. coli* portadoras de *mcr-1*.

MLST: Multilocus sequence typing. PT: pulso tipo. AMC: Amoxicilina-ác. clavulánico; CRO: Ceftriaxona; CAZ: Ceftazidime; CN: Gentamicina; AK: Amikacina; CIP: Ciprofloxacina; ENR: Enrofloxacin; SXT: Trimetropim sulfametoxazol; COL: Colistina

## POLLITOS DE UN DÍA IMPORTADOS DE BRASIL

### 3. Pollitos de un día importados de Brasil

#### 3.A. Identificación de bacterias resistentes a antimicrobianos de importancia crítica en muestras fecal de pollitos de 1 día de vida

Se estudiaron, 8 fechas embarques diferentes de cajas con pollitos BB de un día, durante 2018-2019 (8/8) provenientes de Brasil, en los cuales se hisopó el fondo de las cajas de transporte utilizando dos hisopos estériles por embarque. Cada muestra

obtenida se pre-enriqueció en caldo LB y luego se sembró en medios selectivos suplementados con los antibióticos críticos.

En los 8 embarques analizados, se detectaron bacterias resistentes a al menos uno de los antibióticos evaluados, y en 4/8 se aislaron enterobacterias resistentes en los tres medios suplementados con antibióticos. A partir de estos medios, se recuperaron 72 aislamientos de enterobacterias, lo que indica que, en algunos embarques, se aislaron múltiples cepas con distintos perfiles de resistencia, que según la identificación llevada a cabo por el MALDI-TOF, los mismos correspondieron a: 37 aislamientos de *Escherichia coli*, 30 *Enterobacter cloacae*, y 5 *Klebsiella pneumoniae*.

### **3.B. Estudio de susceptibilidad antimicrobiana en los aislamientos resistencia a antibióticos críticos obtenidas de pollitos de 1 día de vida**

Se realizó el estudio de susceptibilidad a los antimicrobianos, detección de genes de resistencia a los antibióticos y el estudio de clonalidad mediante gel de campo pulsado electrophoresis (PFGE) a los 72 aislamientos. Para evitar resultados duplicados, de cada envío, solo aquellos aislados que presentaron diferencias fenotípicas y/o genotípicas o diferente pulso tipos son presentados. En consecuencia, se seleccionaron 28 aislamientos, incluidos 14 *E. coli* (de las que 14/14 crecieron en medio con CRO, 6/14 también fueron recuperadas en medio con COL y 2/14 en en medio con CIP), 11 *E. cloacae* (de las que 11/11 crecieron en medio con CRO, 6/11 también fueron recuperadas en medio con COL y 6/11 en en medio con CIP), y 3 aislados de *K. pneumoniae* (de las que 3/3 crecieron en medio con CRO y 2/3 también fueron recuperadas en medio con COL), que presentaron resistencia a amoxicilina-ácido clavulánico (64%), ceftriaxona (100%), ceftazidima (67%), cefepima (75%), gentamicina (46%), y ciprofloxacina (39%). Los valores de resistencia más bajos (entre 11% y 25%) fueron observados para trimetoprim-sulfametoxazol, fosfomicina, minociclina, amikacina, tigeciclina y cloranfenicol. Por otro lado, 7 aislamientos presentaron valores de CIM de 4 mg/L para colistina. Por el contrario, todos los aislados fueron susceptibles a los carbapenémicos (Fig. 14).

### **3.C. Genes de resistencia a antimicrobianos críticos encontrados en los aislamientos obtenidos de pollitos de 1 día de vida**

Se evidenció la circulación de genes codificantes para BLEE del tipo *bla*<sub>CTX-M-2</sub> (n = 12), *bla*<sub>CTX-M-8</sub> (n = 7), *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (n = 3) y *bla*<sub>CTX-M-55</sub> (n = 2). Para el caso de las AmpC se evidenció la circulación del gen *bla*<sub>CMY-2</sub> (n = 4). Se detectaron genes de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos en ocho aislamientos, de los cuales cinco llevaban *qnrB19*, mientras que *qnrE1*, *qnrB2* y *qnrE1* más *qnrB19* fueron detectados en un aislado cada uno. En cuanto a la resistencia a los aminoglucósidos, el gen que codifica la ARNr 16S metiltransferasa (16S-RMTasa), *rmtG*, se detectó en 5 de los 6 aislados resistentes a amikacina y gentamicina (fig. 14). Por otro lado, el gen de la aminoglucósido acetilasa *aac(6')Ib* se detectó en un aislamiento (fig. 14). En relación a la resistencia a fosfomicina, se identificaron dos aislamientos de *E. coli* que portaba *bla*<sub>CTX-M-55</sub> junto con *fosA3*, mientras que un *E. cloacae* presentaba *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y *fosA*. Además, se identificó otro aislamiento de *E. cloacae* que contenía *bla*<sub>CTX-M-2</sub> y *fosA2* (Fig. 16). Cabe señalar que el gen de resistencia a la colistina *mcr-9.1* se identificó en cuatro de los siete aislamientos resistentes a la colistina (MIC 4mg/mL) y en dos aislamientos que muestran colistina CIM de ≤1mg/mL (Fig. 14).

### 3.D. Los resultados de los ensayos de conjugación y el PFGE de los aislamientos obtenidos de pollitos de 1 día de vida

Se evaluó la presencia de plásmidos conjugativos en los aislamientos de *E. cloacae*, *K. pneumoniae* y *E. coli* portadores de genes que codifican para BLEE y/o AmpC mediante ensayos de conjugación. De los 11 aislamientos estudiados de *E. cloacae*, se obtuvieron 8 transconjugantes, y mediante PCR se confirmó la presencia de los genes correspondientes: 6 de ellos presentaron *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, 1 portaba *bla*<sub>CTX-M-2</sub> y *qnrE*, y 1 tenía *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y *qnrB*. En cuanto a *K. pneumoniae*, de 3 aislamientos, 1 mostró un plásmido conjugativo, confirmándose la presencia de *bla*<sub>CTX-M-2</sub> y *aac(6')Ib* en sus transconjugantes mediante PCR. Finalmente, de los 14 aislamientos de *E. coli* analizados, 12 presentaron plásmidos conjugativos, observándose que 7 de ellos portaban *bla*<sub>CTX-M-8</sub>, 2 tenían *bla*<sub>CTX-M-55</sub> y *fosA3*, 2 portaban *bla*<sub>CMY-2</sub>, y 1 mostró el gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (Fig. 14).

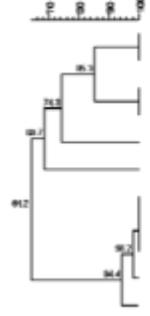
El análisis por PFGE de 11 aislamientos de *E. cloacae* reveló 5 pulsotipos diferentes (PT). Dos de los cinco pulsotipos (PT-I y PT-V) presentaron genes de resistencia a los tres antibióticos críticos de alta prioridad estudiados. Se detectó PT-V en aislamientos

recuperados de dos envíos diferentes y tenía una amplia variedad de resistencia genes, incluidos los genes *mcr-9.1* y *rmtG*.

De los 14 aislamientos de *E. coli*, 13 fueron tipificados por PFGE y uno resultó no tipificable. Se identificaron 12 pulsotipos; dos aislamientos pertenecían a PT-VI, y aunque ambos fueron recuperados del mismo envío, transportaban diferentes BLEE (*bla<sub>CTX-M-8</sub>* vs *bla<sub>CTX-M-2</sub>*) (Fig. 14). Por otro lado, las dos *E. coli* aisladas portadoras de *bla<sub>CTX-M-55</sub>* y *fosA3* pertenecían a diferentes pulsotipos (PT-IX y PT-XII) (Fig. 14).

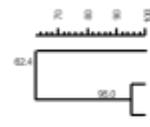
En cuanto a los tres aislamientos de *K. pneumoniae*, se detectaron 2 pulsotipos. El pulso tipo II comprendía dos cepas, recuperadas de diferentes envíos (3 y 7), que llevaban el gen *bla<sub>CTX-M-2</sub>* (Fig. 14).

**Enterobacter cloacae**



Strain	S	GENOTYPE	PT	MIC (mg/L)											TC CRO		
				AMC	CAZ	CTX	FEP	CIP	AK	CN	C	SXT	MIN	FOS		COL	TIG
ODC_Eclo10	5	<i>bla</i> <sub>CTX-M2</sub> / <i>qnrB19</i> / <i>rmtG</i> / <i>mcr9.3</i> / <i>fosA</i>	I	>16/8	≤2	>32	8	0.5	>32	>8	≤8	≤2/38	>8	128	≤1	≤0.5	SI
ODC_Eclo11	5	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> / <i>qnrB19</i> / <i>rmtG</i> / <i>mcr9.3</i> / <i>fosA</i>	I	≤8/4	>32	>32	16	>2	>32	>8	16	≤2/38	>8	128	>4	≤0.5	SI
ODC_Eclo7	3	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> / <i>mcr9.3</i>	II	>16/8	8	>32	>16	1	≤8	>8	16	≤2/38	≤4	0.5	≤1	≤0.5	SI
ODC_Eclo9	3	<i>bla</i> <sub>CTX-M2</sub>	II	>16/8	8	>32	>16	1	≤8	>8	≤8	≤2/38	≤4	≤0.25	≤1	≤0.5	SI
ODC_Eclo2	1	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> / <i>rmtG</i> / <i>mcr9.3</i>	III	>16/8	8	>32	16	≤0.06	>32	>8	≤8	≤2/38	≤4	16	≤1	≤0.5	SI
ODC_Eclo4	2	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> / <i>qnrE1</i>	IV	>16/8	>32	>32	16	1	≤8	>8	≤8	≤2/38	≤4	8	≤1	≤0.5	SI
ODC_Eclo1	1	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> / <i>rmtG</i>	V	>16/8	8	>32	16	0.5	>32	>8	≤8	≤2/38	≤4	2	≤1	≤0.5	NO
ODC_Eclo8	3	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> / <i>qnrB19</i>	V	>16/8	16	>32	>16	0.5	≤8	>8	≤8	≤2/38	8	8	≤1	≤0.5	SI
ODC_Eclo3	1	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> / <i>rmtG</i> / <i>qnrB19</i> / <i>mcr9.3</i>	V	>16/8	8	>32	16	0.5	>32	>8	≤8	≤2/38	≤4	4	≤1	≤0.5	NO
ODC_Eclo6	3	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> / <i>qnrB19</i> / <i>mcr9.3</i>	V	>16/8	8	>32	16	1	≤8	>8	≤8	≤2/38	≤4	8	>4	≤0.5	SI
ODC_Eclo5	3	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	V	>16/8	4	>32	16	0.5	≤8	>8	≤8	≤2/38	≤4	4	≤1	1	NO

**Klebsiella neumonia**



Strain	S	Genotype	PT	MIC (mg/L)											TC CRO		
				AMC	CAZ	CTX	FEP	CIP	AK	CN	C	SXT	MIN	FOS		COL	TIG
ODC_Kpn2	5	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> / <i>qnrB2</i> / <i>qnrE1</i>	I	≤8/4	32	>32	16	>2	>32	>8	>16	>2/38	>8	16	>4	≤0.5	NO
ODC_Kpn1	3	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	II	>16/8	16	>32	>16	≤0.06	≤8	≤4	16	>2/38	≤4	4	≤1	≤0.5	NO
ODC_Kpn3	7	<i>bla</i> <sub>CTX-M2</sub> / <i>aac(6)</i> / <i>fb</i>	III	16/8	16	>32	>16	≤0.06	≤8	≤4	≤8	≤2/38	≤4	≤0.25	>4	≤0.5	SI

**Escherichia coli**



Strain	S	Genotype	PT	MIC (mg/L)											TC CRO		
				AMC	CAZ	CTX	FEP	CIP	AK	CN	C	SXT	MIN	FOS		COL	TIG
ODC_Ec1	1	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	I	>16/8	16	8	≤2	≤0.06	≤8	≤4	≤8	≤2/38	≤4	0.5	≤1	≤0.5	NO
ODC_Ec12	7	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	II	>16/8	8	4	≤2	≤0.06	≤8	≤4	≤8	≤2/38	≤4	≤0.25	≤1	≤0.5	SI
ODC_Ec6	3	<i>bla</i> <sub>CTX-M8</sub>	III	≤8/4	≤2	4	≤2	≤0.06	≤8	≤4	≤8	≤2/38	≤4	≤0.25	≤1	1	SI
ODC_Ec8	5	<i>bla</i> <sub>CTX-M8</sub>	IV	≤8/4	≤2	8	8	0.12	≤8	≤4	≤8	≤2/38	≤4	≤0.25	≤1	≤0.5	SI
ODC_Ec10	6	<i>bla</i> <sub>CTX-M8</sub>	V	≤8/4	≤2	8	4	0.12	≤8	≤4	≤8	2/38	≤4	0.5	≤1	≤0.5	SI
ODC_Ec5	2	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	VI	≤8/4	8	>32	16	≤0.06	≤8	≤4	≤8	≤2/38	≤4	≤0.25	≤1	≤0.5	SI
ODC_Ec2	2	<i>bla</i> <sub>CTX-M8</sub>	VI	>16/8	≤2	4	4	≤0.06	≤8	≤4	≤8	≤2/38	≤4	≤0.25	>4	≤0.5	SI
ODC_Ec4	2	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	VII	>16/8	16	8	≤2	≤0.06	≤8	≤4	≤8	≤2/38	≤4	≤0.25	≤1	≤0.5	NO
ODC_Ec9	5	<i>bla</i> <sub>CTX-M8</sub>	VIII	≤8/4	≤2	4	8	0.12	≤8	≤4	16	≤2/38	≤4	≤0.25	≤1	1	SI
ODC_Ec13	8	<i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub> / <i>fosA3</i>	IX	≤8/4	8	32	4	≤0.06	≤8	≤4	16	≤2/38	≤4	128	≤1	≤0.5	SI
ODC_Ec14	8	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	X	>16/8	16	8	≤2	≤0.06	≤8	≤4	≤8	≤2/38	≤4	0.5	≤1	≤0.5	SI
ODC_Ec3	2	<i>bla</i> <sub>CTX-M8</sub> / <i>qnrB19</i>	XI	≤8/4	≤2	4	≤2	0.12	≤8	8	≤8	≤2/38	>8	≤0.25	≤1	1	SI
ODC_Ec7	4	<i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub> / <i>fosA3</i>	XII	≤8/4	4	32	4	>2	≤8	≤4	>16	>2/38	8	256	≤1	≤0.5	SI
ODC_Ec11	7	<i>bla</i> <sub>CTX-M8</sub>	NT	≤8/4	≤2	4	≤2	0.25	≤8	≤4	≤8	≤2/38	≤4	≤0.25	≤1	2	SI

Figura 14 Electroforesis de gel en campo pulsado (pfge) de 28 pollitos de 1 día (day-old chicks) (adc). “genotipo” se refiere a los genes de resistencia detectados por PCR, susceptibilidad a antibióticos testados y transconjugantes

Nomenclatura: Eclo, *E. cloacae*; Kpn, *K. pneumoniae*; Ce, *E. coli*; S, número de envío al aeropuerto; PT, pulsotipo; AMC, amoxicilina-ácido clavulánico; CAZ, ceftazidima; CTX, cefotaxima; FEP, cefepima; CIP, ciprofloxacina; AK, amikacina; CN, gentamicina; C, cloranfenicol; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; MIN, minociclina; FOS, fosfomicina; COL, colistina, TC CRO, transconjugantes obtenidos resistentes a ceftriaxona

## 4. Secuenciación del genoma completo (WGS) de aislamientos seleccionados

### 4.A. Selección de aislamientos para secuenciación de genoma

Se analizaron las secuencias genómicas del aislamiento de *K. pneumoniae* ODC\_Kpn3, resistente a colistina y oxiiiminocefalosporinas; del aislamiento de *E. coli* ODC\_Ec7, que presentó resistencia a oxiiiminocefalosporinas y fosfomicina y de los aislamientos *E. cloacae* ODC\_Eclo3 y ODC\_Eclo10, que mostraron resistencia a colistina, oxiiiminocefalosporinas y aminoglucósidos (Fig. 15).

### 4.B. Análisis de secuenciación del genoma completo (WGS) de aislamientos seleccionados

#### 4.B.1. Análisis genómico de *K. pneumoniae* ODC\_Kpn3

El análisis genómico del aislamiento *K. pneumoniae* ODC\_Kpn3 reveló que pertenece al ST37 y porta tres plásmidos de los grupos de incompatibilidad IncFIB, IncN y ColE1-like. Este aislamiento contiene genes que confieren resistencia a cuatro familias diferentes de antibióticos: aminoglucósidos [*aac(6')-Ib*, *aph(3')-Ib* y *aph(6)-Id*],  $\beta$ -lactámicos (*bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>OXA-2</sub> y *bla*<sub>SHV-11</sub>), sulfonamidas (*sul1*) y fosfomicina (*fosA2*). ODC\_Kpn3 mostró una CIM superior a 4 mg/L para colistina. Aunque no se encontraron genes de resistencia transferibles a colistina, se detectaron tres mutaciones en genes reguladores: dos en *pmrB* (R256G y T246A) y una en *ccrB* (C68S). No se observaron mutaciones en los genes *pmrA*, *mgrB*, *phoP* o *phoQ*, lo que indica que las mutaciones en *pmrB* y *ccrB* podrían estar relacionadas con la resistencia observada a colistina (Fig. 15).

#### 4.B.2. Análisis genómico de *E. coli* ODC\_Ec7

El análisis de *E. coli* ODC\_Ec7 MLST reveló que pertenece al ST224. Su perfil de resistencia incluye  $\beta$ -lactámicos (oxiiiminocefalosporinas), fosfomicina, trimetoprim-sulfametoxazol, cloranfenicol y ciprofloxacina. Esta resistencia está asociada con la presencia de los genes *bla*<sub>CTX-M-55</sub>, *bla*<sub>TEM-1b</sub>, *fosA3*, el tándem *dfr12/sul3*, *cmlA1* y mutaciones en los genes *gyrA* (D87N y S83L), *parC* (S80I) y *parE* (S458A). También se detectaron los genes *tetA* y *aadA1/aadA2*, responsables de la resistencia a tetraciclina y estreptomicina, respectivamente. La cepa ODC\_Ec7 pertenece al serotipo O114 y, según su perfil de virulencia, corresponde al patotipo de patógeno extraintestinal de *E. coli* (ExPEC). El análisis *in silico* indicó la presencia de genes de

virulencia como *papC*, *afaD*, *hra*, *iha* y *lpfA* (relacionados con adhesinas); *iucC*, *iutA* y *sitA* (asociados con sideróforos y transportadores de hierro); *iss* y *traT* (que confieren resistencia al poder bactericida del suero); el gen que codifica la toxina EAST-1; y los genes *celB*, *cia*, *cma* y *cvaC* (que codifican colicinas y microcinas) demostrando que ODC\_Ec7 es una cepa virulenta y multiresistente (Fig. 15).

Strains	ODC_Eclo3	ODC_Ec7	ODC_Eclo10	ODC_Kpn3
Identification	<i>E. cloacae</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>K. pneumoniae</i>
ST	145	224	32	37
ColE1 like	Black	Black	Black	Black
IncHI2/HI2A	Black	White	Black	White
IncN2	Black	White	Black	White
IncQ1	Black	White	Black	White
IncFIB	White	Black	White	Black
IncFII	White	White	White	Black
IncN	White	Black	White	Black
IncX1	White	Black	White	White
<i>aac(6)/Ib</i>	Black	White	Black	Black
<i>aadA1</i>	Black	Black	Black	White
<i>aadA2</i>	White	Black	White	White
<i>aac(3)-IIa</i>	Black	White	Black	White
<i>aph(3'')/Ib</i>	Black	White	Black	Black
<i>aac(3)-Via</i>	Black	White	Black	White
<i>aph(6)/Id</i>	White	White	White	Black
<i>rmtG</i>	Black	White	Black	White
<i>bla<sub>SHV-11</sub></i>	White	White	White	Black
<i>bla<sub>TEM-1b</sub></i>	White	Black	White	White
<i>bla<sub>OXA-2</sub></i>	White	White	White	Black
<i>bla<sub>ACT-90</sub></i>	Black	White	White	White
<i>bla<sub>ACT-52</sub></i>	White	White	Black	Black
<i>bla<sub>CTX-M-2</sub></i>	Black	Black	Black	Black
<i>bla<sub>CTX-M-55</sub></i>	White	Black	White	White
<i>fosA2</i>	Black	Black	Black	Black
<i>fosA3</i>	White	Black	Black	Black
<i>mcr-9</i>	Black	White	Black	Black
<i>sul1</i>	Black	Black	Black	Black
<i>Sul3</i>	White	Black	White	White
<i>dfrA12</i>	White	Black	White	White
<i>qnrB19</i>	Black	White	Black	White
<i>tetA</i>	White	Black	White	White
<i>cmlA1</i>	White	Black	White	White

Figura 15 Distribución de replicones de plásmidos y genes de resistencia entre las cuatro cepas secuenciadas. las celdas negras indican presencia y las celdas blancas indican ausencia.

### 4.B.3. Análisis genómico de *E. cloacae* ODC\_Eclo3 y ODC\_Eclo10

Los aislamientos *E. cloacae* ODC\_Eclo3 y ODC\_Eclo10 pertenecen a los secuenciotipos ST145 y ST32, respectivamente, y comparten cuatro plásmidos de los grupos de incompatibilidad IncQ1, IncHI2/2A, IncN2 y ColE1-like. Ambos aislamientos contienen 12 genes que confieren resistencia a diversas familias de antibióticos, incluyendo  $\beta$ -lactámicos, fluoroquinolonas, colistina, aminoglucósidos, fosfomicina e inhibidores de la vía del folato. Entre los genes más relevantes detectados se encuentran *mcr-9.1* (colistina), *rmtG* (aminoglucósidos) y *bla<sub>CTX-M-2</sub>* ( $\beta$ -lactámicos). Además, ambos aislamientos portan *fosA2*, así como los genes *bla<sub>ACT-90</sub>* y *bla<sub>ACT-52</sub>*.

Dada la coexistencia de estos genes de resistencia en ODC\_Eclo3, este aislamiento fue seleccionado para la secuenciación híbrida, lo que permitió obtener la secuencia completa de su cromosoma y plásmidos. El genoma de ODC\_Eclo3 consta de un cromosoma de 4,8 Mb con un contenido de GC de 54,9%, y cuatro plásmidos: pIncHI2/2A (408,4 kb), pIncN2 (59,3 kb), pIncQ (7,4 kb) y pColE-like (11,5 kb). Diez de los 12 genes de resistencia de ODC\_Eclo3 se distribuyen entre tres plásmidos: IncQ, IncHI2/2A e IncN2, lo que sugiere un papel clave de los plásmidos en la diseminación de resistencia en esta cepa.

### 4.C. Análisis de los plásmidos del aislamiento ODC\_Eclo3

#### 4.C.1. Análisis de plásmido IncQ

El plásmido pUR-EC3.1, perteneciente al grupo de incompatibilidad Q, presenta una región de 6137 pb con un 99% de identidad con el plásmido pRSF1010 (GenBank HE654726). Esta región incluye siete marcos abiertos de lectura (ORFs) que codifican proteínas clave para la replicación (RepA y RepC) y movilidad (MobABC), así como dos proteínas hipotéticas y 394 pb del gen *sul2* (Fig. 17). Los genes *repC*, *mobA* y *mobC* contienen tres secuencias chi (59-GCTGGTGG-39), que actúan como dianas para los productos *recBCD*, facilitando eventos de recombinación homóloga (Cheng et al., 2020).

El gen *sul2* fue interrumpido por una región de 1283 pb que contiene los genes *rmtG* y *rsml-like* (Fig. 17), los cuales codifican metiltransferasas dependientes de S-adenosilmetionina (MTasas S-AdoMet). De estos, *rmtG* es particularmente relevante ya que confiere resistencia a una amplia gama de aminoglucósidos. Esta región de

1283 pb es idéntica a la que se encuentra en el plásmido pEc13 (GenBank MH325469), detectado en un aislado brasileño de *Enterobacter hormaechei* obtenido de una infección del tracto urinario (ITU), lo que resalta su posible diseminación global y su papel en la resistencia a antibióticos (Martins et al., 2020).

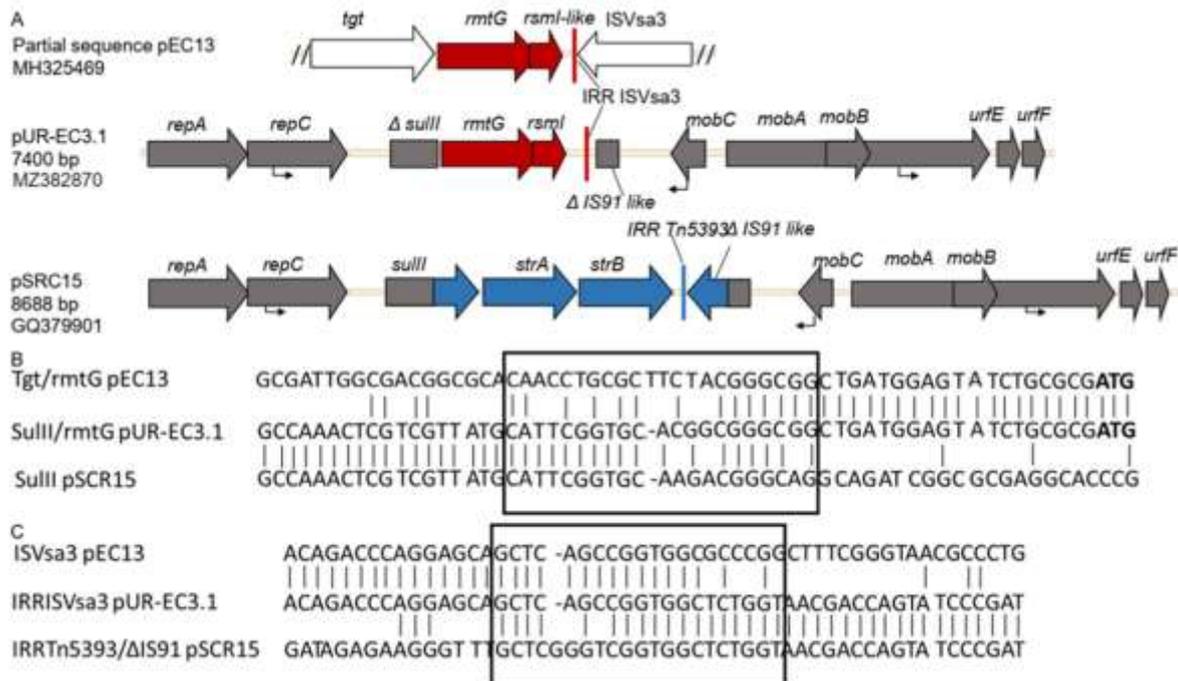


Figura 16 Mapa esquemático de pUR-EC3.1 y comparación con pSRC15 y la región portadora de rmtG presente en el plásmido pec13 (secuencia parcial). (A) Regiones de la identidad de nucleótidos entre pUR-EC3.1 y pSRC15 se muestra en gris, mientras que las regiones de nucleótidos entre pUR-EC3.1 y pEC13 se muestran en rojo. En azul están los genes supuestamente perdidos durante los eventos de recombinación. Las flechas negras indican la ubicación de las secuencias Chi, ubicadas en repC, mobA, y genes mobC y orientados en su respectiva dirección de transcripción. (B) Alineación del extremo 59 de la región de codificación rmtG presente en pUREC3.1 ( $\Delta$ sul2-rmtG) con la región sul2 correspondiente en pSRC15 y la región tgt-rmtG presente en pEC13. (C) Alineación de la codificación rmtG región encontrada en pUR-EC3.1 (IRR ISVsa3:: $\Delta$ IS91) con la región correspondiente a IRR Tn5393::  $\Delta$ IS91-sul2 presente en pSRC15 y con ISVsa3 en pEC13. Las secuencias encuadradas corresponden a zonas de alta identidad de nucleótidos entre los tres plásmidos analizados.

#### 4.C.2. Análisis del plásmido InChI2/2A.

El plásmido pUR-EC3.2, perteneciente al grupo de incompatibilidad InChI2/2A, tiene un tamaño de 408.436 pb y un contenido de GC del 50,28%. El análisis BLASTn reveló que este plásmido presenta similitudes con "superplásmidos" que confieren resistencia a carbapenémicos, reportados recientemente en Australia (Fig. 17). Sin embargo, a diferencia de estos plásmidos que pertenecen al secuenciotipo ST 1, pUR-EC3.2 fue asignado al nuevo secuenciotipo ST16 (García-Fernández & Carattoli, 2010). Para caracterizar este nuevo plásmido, seguimos el esquema propuesto por García-Fernández y Carattoli, basado en la detección de 11 amplicones del backbone y en la secuencia del gen repA (García-Fernández & Carattoli, 2010). En este sentido, el

replicón de pUR-EC3.2 era 100% idéntico a HIA-R478 (su contraparte en el plásmido pR478), consistente en los dos determinantes de replicación basados en iterón, RepHIA y RepHI2; sin embargo, al aplicar el esquema mencionado anteriormente, detectamos varias diferencias interesantes. Mientras encontramos los cinco amplicones comunes a los plásmidos IncHI2, los amplicones relacionados con pR478, *tnsD* y *smrD*, estaban ausentes; en cambio, el O1R\_160, relacionado con plásmidos del tipo HI2-APEC-O1-R, estaba presente en pUR-EC3.2. Basados en estos hallazgos, hipotetizamos que pUR-EC3.2 ST16 podría ser un nuevo subtipo del plásmido IncHI2/2A pR478. En este contexto, *bla*<sub>CTX-M-2</sub> constituiría parte de tal estructura “híbrida”, ya que este gen de la BLEE está asociado principalmente con plásmidos del tipo HI2-APEC-O1-R (Darphorn et al., 2021; Guo et al., 2016; Macesic et al., 2021). Así, hasta donde sabemos, esta es la primera descripción de un plásmido derivado de CTX-M-2-R478.

En cuanto a los genes de resistencia, pUR-EC3.2 albergaba varios operones que confieren resistencia a metales pesados (mercurio) y metaloides (arsénico y telurio), así como genes que confieren resistencia a oximiinocefalosporinas, aminoglucósidos, sulfonamidas y polimixinas. En este contexto, los genes de resistencia a las primeras tres familias de antibióticos estaban codificados en un integrón de clase 1 complejo que contenía *aadA1*, *aac(39)-VIa* como parte de su región variable *qacEΔ1*, *sul1* como parte del 39CR, *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, vinculado a un *ISCR1*, y una segunda copia del 39CR formada por una fusión *orf3/qacEΔ1* y *sul1*. Este integrón ya ha sido descrito para el plásmido pESBL3227-Incl (13), flanqueado por TnAs3 e IS91; sin embargo, en pUR-EC3.2 estaba incrustado en un nuevo transposón compuesto similar a Tn1696, designado Tn7337 (Fig. 18).

Tn7337 mantiene los genes *tnpA*, *tnpR*, las repeticiones invertidas IRR (repetición invertida derecha) e IRL (repetición invertida izquierda) (la primera interrumpida por IS4321R), los primeros 30 nucleótidos de IS6100 IRL y una copia truncada del operón de resistencia al mercurio *merRTPCADE* (a Tn7337 le falta la región 3' de *merE*). A diferencia de Tn1696, reportado por Partridge et al. (Partridge et al., 2001), Tn7337 presenta una copia de IS26 en lugar de la región de 1,733 pb que incluye IS6100, *urf2* y 101 pb correspondientes a la región 3' de *merE* (Fig. 18).

Además, la inserción de IS26 resultó en la delección del extremo 3' del gen *merE*; serían necesarios estudios adicionales para determinar si la inserción de IS26 ha afectado la función del operón *mer*.

Por otro lado, la posible resistencia del plásmido a polimixinas se debe a la presencia del gen fosfoetanolamina transferasa *mcr-9.1*. Este gen estaba flanqueado en sentido ascendente por una transposasa similar a IS903 y en sentido descendente por el gen de la metaloproteasa con pliegue cupina, *wbuC*, seguido por IS26; se ha descrito un contexto similar para varios plásmidos IncHI2/2 en *E. cloacae* (acceso GenBank no. CP020529.1), *E. hormaechei* (acceso GenBank no. CP031575.1) y *Cronobacter sakazakii* (acceso GenBank no. CP028975.1), entre otros (Macesic et al., 2021; Kieffer et al., 2019). Sin embargo, en comparación con dichos plásmidos, la orientación de IS26 en pUR-EC3.2 estaba invertida (es decir, ubicada en la misma cadena que *wbuC*, *mcr-9.1* e IS903).

Aunque el contexto genético de *mcr-9.1* en pUR-EC3.2 también incluía una región conservada de aproximadamente 30 kb aguas arriba (que contiene los transportadores de eflujo de níquel-cobalto *rcnR/rcnS*, proteínas sensoriales y el operón de resistencia al arsénico), faltaba el sistema de dos componentes *qseB/qseC* que participa en la expresión de *mcr-9.1*.

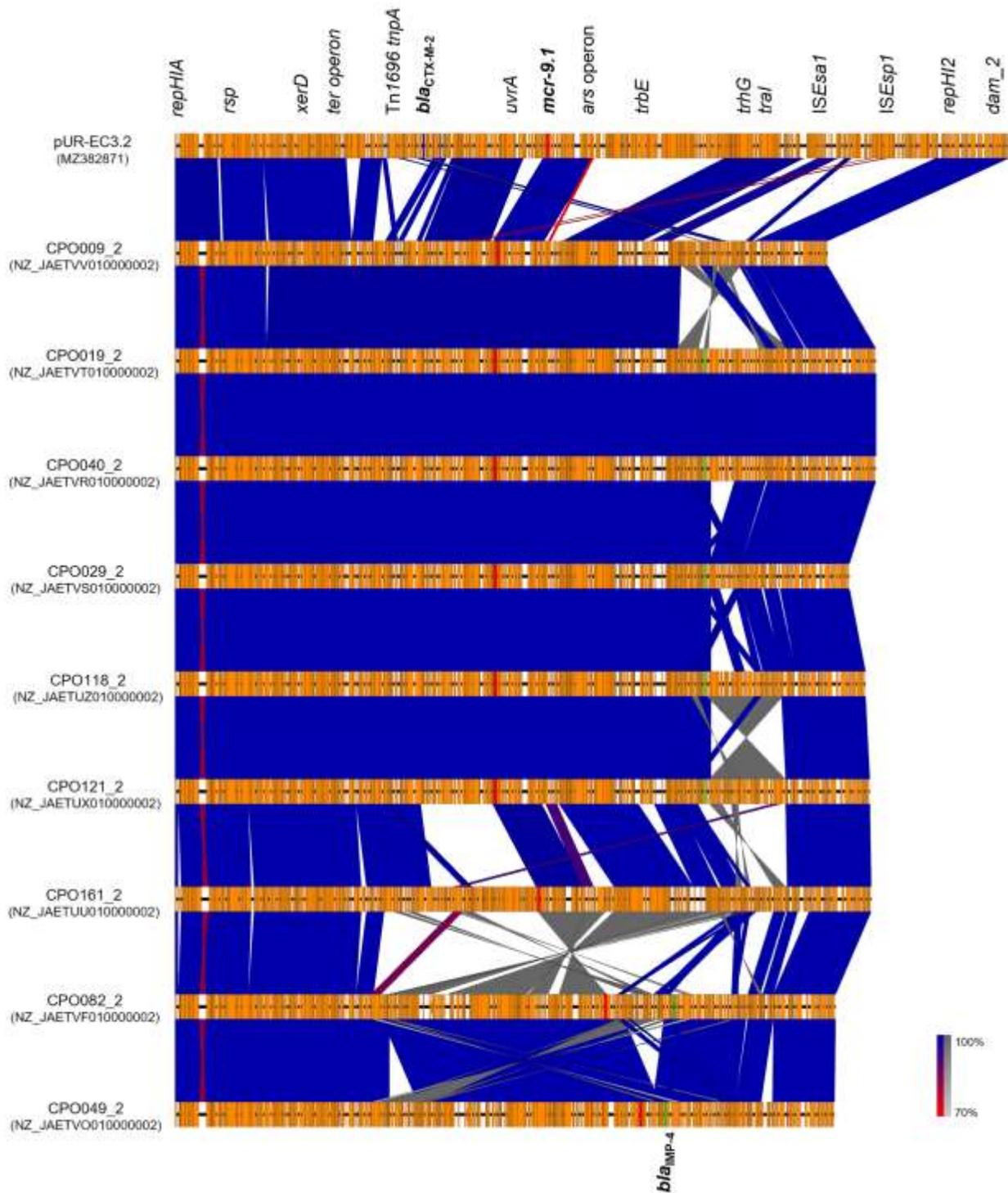


Figura 17 Alineación lineal del plásmido *pur-ec3.2* con un grupo de plásmidos portadores de *mcr-9.1* descritos recientemente (los números de acceso están en paréntesis). Las regiones de máxima identidad de nucleótidos se indican en azul profundo y las regiones de mínima identidad se representan en rojo. Las regiones invertidas entre diferentes plásmidos se muestran en gris. Genes que confieren resistencia a antibióticos de importancia crítica en *pur-ec3.2*, *bla<sub>CTX-M-2</sub>* y *mcr-9.1* se muestran en cian y rojo, respectivamente; del mismo modo, se representan los alelos *mcr-9* en los otros plásmidos en el mismo color. El gen de resistencia a carbapenémicos *bla<sub>IMP-4</sub>* se muestra en verde brillante.

Los análisis de predicción de promotores *in silico* indicaron la presencia de posibles regiones promotoras cercanas a un gen; se requieren estudios adicionales para evaluar la expresión de *mcr-9.1*. En este sentido, los ensayos de transferencia de plásmidos no han tenido éxito hasta ahora.

La presencia de *bla*<sub>CTX-M-2</sub> y *mcr-9.1* ya ha sido documentada, aunque por separado, en plásmidos IncHI2/2A; hasta donde sabemos, este es el primer informe de la coexistencia de estos dos genes de resistencia en un mismo plásmido.

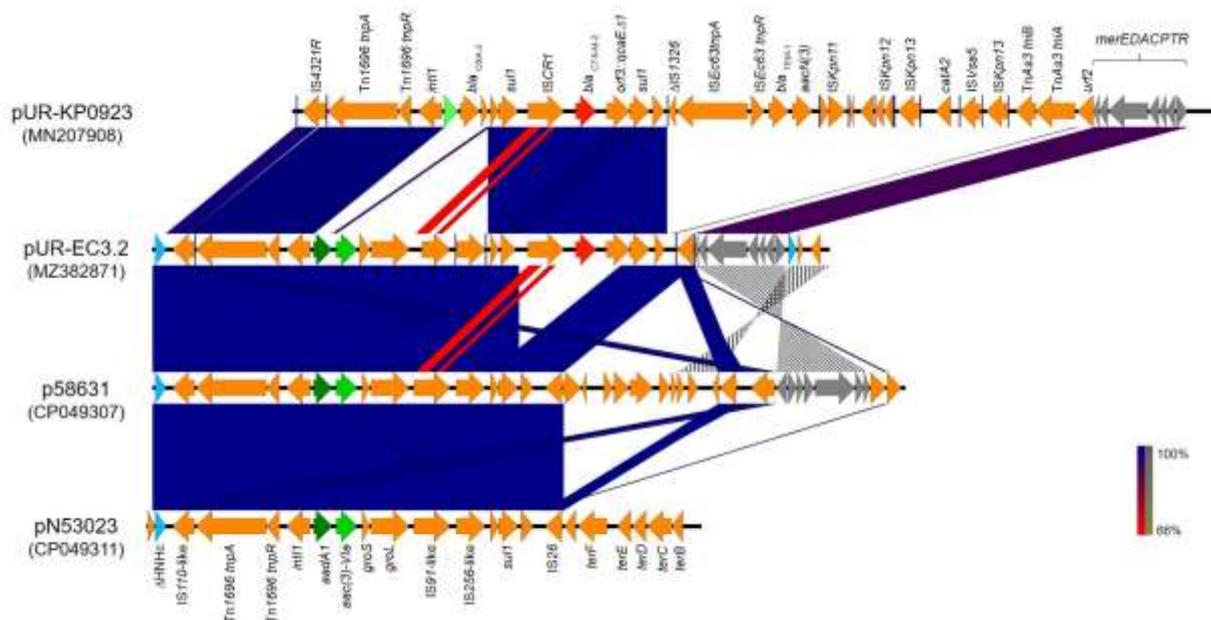


Figura 18 Comparación entre el Tn7337 que contiene el integrón complejo de clase 1 que lleva *bla*<sub>CTX-M-2</sub> en *pur-ec3-2* y contextos genéticos similares descritos para otros plásmidos (los números de acceso están entre paréntesis). La alineación se dibuja de acuerdo con el mejor BLAST; los bloques de homología en azul oscuro indican máxima identidad de nucleótidos, mientras que los bloques rojos indican regiones de mínima identidad de nucleótidos. los bloques grises a cuadros o rayados se muestran regiones invertidas. código de color cds: en rojo, *bla*<sub>CTX-M-2</sub>; tonos de verde, genes modificadores de aminoglucósidos; gris pizarra, operón de resistencia al mercurio; cyan, 59 y 39 regiones de una endonucleasa HNHc truncada. las líneas verticales representan repeticiones invertidas asociadas con las diversas secuencias de inserción.

#### 4.C.3. Análisis del plásmido IncN2.

El tercer plásmido de resistencia fue pUR-EC3.3, un plásmido perteneciente al grupo de incompatibilidad IncN2; este plásmido abarcaba 59.3 kb y tenía un contenido de GC del 52.82%. Los plásmidos IncN son plataformas genéticas que juegan un papel importante en la diseminación de genes de resistencia entre Enterobacterales; estos plásmidos se pueden subdividir en tres grupos (es decir, IncN1, IncN2 e IncN3), y

aunque comparten espinas dorsales similares, la homología de la secuencia de nucleótidos es limitada (Jiang et al., 2017). Sólo unas pocas secuencias de plásmidos IncN2 están disponibles en la base de datos GenBank; la alineación de pUR-EC3.3 con dichos plásmidos muestra varias regiones conservadas correspondientes a genes del backbone, intercaladas por diferentes secuencias de inserción y genes de resistencia (Fig. 19). En este sentido, pUR-EC3.3 presentaba dos “bloques” de resistencia a antibióticos, que conferirían resistencia a quinolonas, aminoglucósidos, sulfonamidas y compuestos de amonio cuaternario.

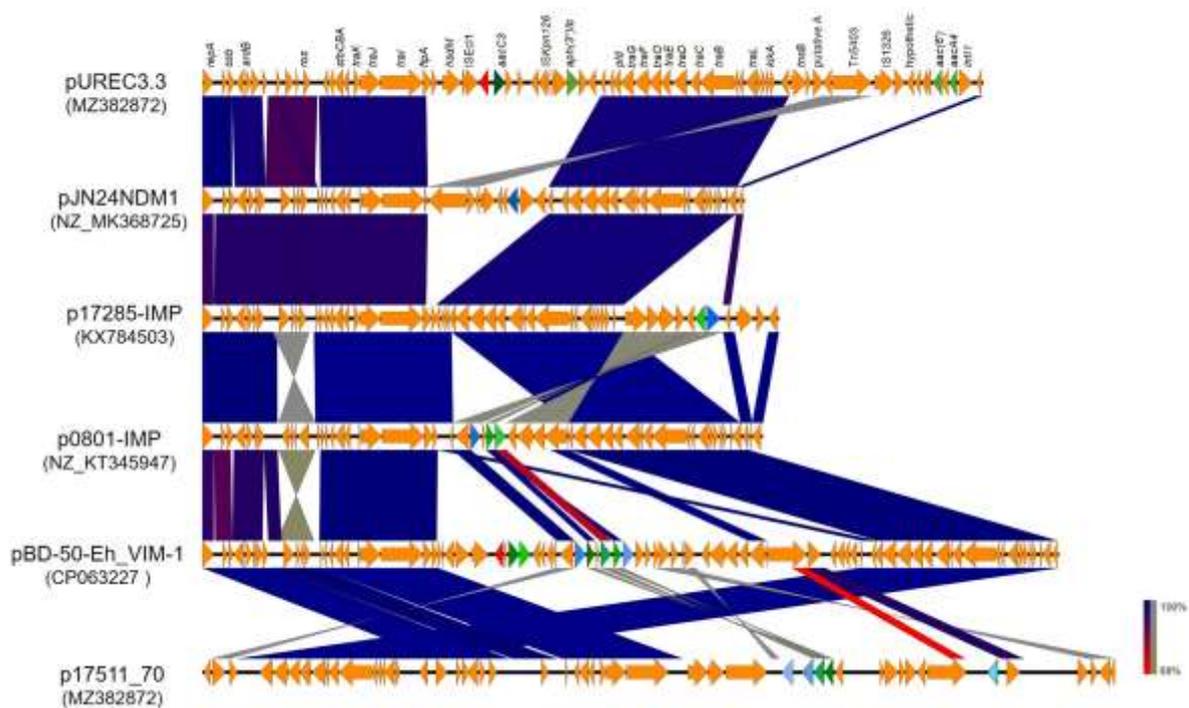


Figura 19 Alineación lineal del plásmido pUR-EC3.3 frente a otros plásmidos IncN2 disponibles en bases de datos públicas (los números de acceso están entre paréntesis). Regiones de máxima identidad de nucleótidos se indican en azul oscuro; por el contrario, las regiones de identidad mínima se indican en rojo. Regiones invertidas entre los diferentes plásmidos se indican en gris. código de color CDS: rojo, *qnrB19*; tonos de verde, genes modificadores de aminoglucósidos; tonos de azul, genes de  $\beta$ -lactamasa.

El primer bloque abarca aproximadamente 10 kb y consiste en *ISEc11*, *qnrB19*, *aacC3*, una proteína de resistencia a la tunicamicina, dos ORFs no caracterizados, *ISKpn12*, una transposasa similar a *IS1133*, *aph(30)-Ib*, y *aph(6)-Id* truncado por la inserción de un *ISKox11* incompleto. Las búsquedas de similitud de nucleótidos arrojaron solo coincidencias parciales, una consistente en la región comprendida entre *aacC3* y  $\Delta$ *ISKo11*, otra correspondiente únicamente a *qnrB19*, y una tercera región consistente en *ISEc11*. Esto sugiere al menos dos eventos de inserción: el primero consistió en el reclutamiento del segmento *aacC3*- $\Delta$ *ISKo11* de la cepa de *Salmonella*

*enterica* AR\_0127 plasmido unnamed1 (número de acceso GenBank CP021952.1) o del cromosoma de *E. coli* (las coincidencias BLASTn más cercanas). El otro evento de inserción corresponde al reclutamiento de *qnrB19* por ISEc11. La frecuente presencia del gen *qnrB19* en plásmidos del tipo CoIE los hace una fuente probable para este evento.

Por otro lado, el segundo bloque de resistencia consistía en un integrón de clase 1 que contenía los siguientes casetes génicos: *aacA4*, un ORF no caracterizado, una fusión *aac(69)-30/aac(69)-Ib*, *qacEΔ1* y *sul1*.

Los plásmidos IncN2 disponibles en GenBank están asociados principalmente con genes de carbapenemasa, principalmente variantes de *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> y *bla*<sub>VIM</sub>; otras betalactamasas detectadas en estos plásmidos incluyen derivados de *bla*<sub>OXA</sub> y *bla*<sub>SHV</sub>. La presencia de genes *qnrB19* se ha asociado principalmente con pequeños plásmidos del tipo CoIE; hasta ahora, solo se han reportado dos plásmidos IncN2 que portan este gen, a saber, pBD-50-Eh\_VIM-1 (número de acceso GenBank CP063227) y pUR-EC3.3, detectado en nuestro estudio. Aunque ambos plásmidos fueron detectados en aislamientos de *E. cloacae*, pBD-50-Eh\_VIM-1 fue recuperado de un aislamiento clínico en Alemania (Jiang et al., 2017), mientras que pUR-EC3.3 fue recuperado de heces de pollitos de un día en Uruguay.

# DISCUSIÓN



## DISCUSIÓN

### SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE URUGUAY

#### 1.A Sistema productivo, tipo de establecimiento y especie animal

La resistencia a antibióticos críticos como ciprofloxacina, ceftriaxona y colistina en bacterias aisladas de animales de producción representa un grave problema de salud pública, dado que estos antimicrobianos son fundamentales en el tratamiento de infecciones en humanos (Cassini et al., 2019; OMS, 2017c). En el presente estudio se evaluó la presencia de *E. coli* resistentes a estos antibióticos en tres especies animales (terneros, aves y cerdos), encontrando mayores proporciones de resistencia en aves y cerdos. Estos hallazgos concuerdan con investigaciones previas que señalan que estos animales, especialmente los criados en sistemas de producción intensiva, están más expuestos a antibióticos, lo que favorece la selección y propagación de bacterias resistentes (Balcázar et al., 2006; Marshall & Levy, 2011).

En terneros, de los 100 animales muestreados, el 55% presentó crecimiento en medios con antimicrobianos críticos; de estos, la resistencia se concentró en CIP (54 aislamientos), mientras que un único aislamiento mostró resistencia adicional a CRO y ninguno a COL. Este patrón sugiere una posible exposición más limitada a CRO y COL en comparación con CIP en los sistemas de producción de terneros estudiados. Además, el análisis por establecimiento evidenció variaciones significativas: en los establecimientos E3 y E5, el número de terneros colonizados superó el 50%, mientras que en E1, E2 y E4 se mantuvo por debajo del 50%. Agrupando los establecimientos en dos grupos (menor y mayor del 50% de colonización), se encontró que los terneros en el grupo con menor colonización (E1, E2, E4) presentaron significativamente menos resistencia a CIP ( $p < 0.001$ ,  $X^2 = 26.305$ ), lo que sugiere que factores específicos del manejo o exposición antimicrobiana en cada establecimiento podrían estar influyendo en la resistencia. Diversos estudios han mostrado que prácticas como la administración profiláctica de antibióticos y el control ineficiente de infecciones facilitan la propagación de microorganismos resistentes (McEwen & Collignon, 2018; Van Boeckel et al., 2015). Sin embargo, la falta de información precisa sobre estos factores dificulta el diseño de medidas efectivas. Esto resalta la importancia de generar y usar datos de calidad para tomar decisiones informadas, algo que no siempre se aplica en los sistemas productivos. Esta falta de enfoque basado en

evidencia limita la implementación de estrategias eficaces para reducir la propagación de la RAM (Aboushady et al., 2023).

En las aves de producción, el 89% de los 132 animales muestreados presentó *E. coli* resistente a uno o más antibióticos críticos. Este alto porcentaje de resistencia, consistente en todos los establecimientos, sugiere una fuerte presión selectiva derivada del uso constante de antimicrobianos en la producción avícola intensiva (Marshall & Levy, 2011). De manera similar, en los cerdos, el 94% de los 50 animales muestreados mostró resistencia a uno o más antibióticos, un patrón observado en todos los establecimientos. Este hallazgo refuerza la idea de que los sistemas de producción intensiva, particularmente en aves y cerdos, crean condiciones que favorecen la selección de bacterias resistentes debido al uso sostenido de antimicrobianos para la profilaxis y el control de enfermedades en ambientes de alta densidad (Balcázar et al., 2006; Marshall & Levy, 2011; Prescott, 2008; Van Hoek et al., 2011).

### **1.B Aislamiento de *E. coli* resistentes a antibióticos críticos por especies animal.**

Los porcentajes de animales portadores de *E. coli* resistentes a antibióticos críticos obtenidos en este trabajo son elevados: el 55% de los terneros presentaron aislamientos con resistencia a CIP, mientras que en aves y cerdos esta proporción fue de 79.55% y 92%, respectivamente. Estas diferencias son consistentes con hallazgos previos que sugieren que las tasas de resistencia antimicrobiana pueden variar considerablemente entre especies animales debido a factores como el uso diferencial de antibióticos en la producción animal y las prácticas de manejo (Laxminarayan et al., 2015; Van Boeckel et al., 2015).

En cuanto a la resistencia a CRO, el 1% de los terneros presentó un aislamiento resistente, el 17.42% de las aves y los cerdos un 72%. La ceftriaxona, un antibiótico de amplio espectro utilizado en medicina veterinaria y humana, ha visto aumentada su resistencia debido al uso indiscriminado de antibióticos en la producción animal, lo cual ha sido bien documentado en la literatura (EMA, 2009, 2016; Hassoun-Kheir et al., 2020). La resistencia a las C3G, como CRO, se está convirtiendo en un problema para la salud pública, ya que puede transmitirse entre animales y humanos. Esta transmisión puede ocurrir de manera directa, al entrar en contacto con animales y/o humanos portadores de bacterias resistentes, o de forma indirecta, a través de la

cadena alimentaria, el agua, el aire y los suelos fertilizados con lodos contaminados. En los cerdos, se ha observado un aumento preocupante en la resistencia a estos antibióticos, incluso en lugares donde su uso es más controlado. Esto sugiere que los genes que hacen a las bacterias resistentes pueden moverse entre las poblaciones de animales y humanos, aumentando el riesgo de que esta resistencia se difunda ampliamente (Van Boeckel et al., 2015).

Respecto a colistina, considerada uno de los últimos recursos terapéuticos en infecciones multirresistentes en humanos, no se observaron aislamientos resistentes en terneros, mientras que en aves solo el 0.76% mostró resistencia. Sin embargo, en los cerdos, el 14% de los aislamientos resultaron resistentes, lo que plantea serias preocupaciones sobre el uso de colistina en producción porcina, un tema que ha sido extensamente debatido debido a su impacto en la salud pública (Wang et al., 2018). La colistina es una de las últimas opciones terapéuticas disponibles para infecciones causadas por bacterias multirresistentes en humanos, y la emergencia de resistencia en la producción animal podría limitar gravemente su efectividad (Olaitan et al., 2014).

Los análisis estadísticos realizados mostraron algunas asociaciones significativas entre la especie y la resistencia a los antimicrobianos. Por ejemplo, la resistencia a ciprofloxacina fue significativamente mayor en aves en comparación con terneros ( $p < 0.001$ ), mientras que la comparación entre aves y cerdos no resultó significativa, lo que indica que ambos grupos presentan niveles similares de resistencia. Varios estudios han mostrado cómo la presión selectiva generada por el uso frecuente de fluoroquinolonas en sistemas productivos como la avicultura contribuye a la aparición y diseminación de bacterias resistentes a estos antimicrobianos en las poblaciones animales. La exposición repetida a fluoroquinolonas en los sistemas de producción animal, podría estar directamente relacionada con la alta frecuencia de resistencia observada en estos animales (Marshall & Levy, 2011; Van Boeckel et al., 2015).

En el caso de ceftriaxona, se observó una alta resistencia en cerdos, lo que fue significativamente mayor que en aves y terneros ( $p < 0.001$ ). Este hallazgo confirma lo observado en estudios anteriores que destacan el alto uso de cefalosporinas en la producción porcina. Por ejemplo, en Dinamarca, el consumo de cefalosporinas de tercera y cuarta generación en la producción porcina ha aumentado rápidamente a

partir de 2001, alcanzando el consumo total de 97,2 kg de compuesto activo en 2008; a pesar de este consumo relativamente bajo, el uso se ha generalizado en los rebaños reproductores, especialmente en lechones (Agersø et al., 2012), aunque actualmente se reporta que el tratamiento de cerdos ha cambiado notablemente en este país (DANMAP, 2023).

Por último, la resistencia a colistina fue significativamente mayor en cerdos en comparación con aves y terneros ( $p < 0.001$ ), lo que concuerda con informes sobre la elevada resistencia en cerdos debido al uso prolongado de colistina como promotor de crecimiento (Liu et al., 2016).

### **1.C Análisis de susceptibilidad antimicrobiana en los aislamientos de *E. coli* resistentes a antibióticos críticos por especie animal.**

En este estudio se trabajó con 73 aislamientos de *E. coli* provenientes de terneros, 140 de aves y 99 de cerdos. Los resultados obtenidos sobre la susceptibilidad de *E. coli* a diversos antibióticos en estas especies muestran variaciones significativas según el origen animal. Para el caso de amoxicilina con ácido clavulánico se observó una variabilidad en las proporciones de aislamientos de *E. coli* no susceptibles entre especies, con un 1.37% en bovinos y un 56.57% en cerdos. Ceftazidime, por su parte, fue efectiva en todos los aislamientos de bovinos, mientras que se observó no susceptibilidad en un 7.80% de las aves y un 22.22% de los cerdos. Ceftriaxona mostró una baja proporción de aislamientos de *E. coli* no susceptibles en bovinos (1.37%), en contraste con aves (16.31%) y cerdos (44.44%). Esta disparidad resalta cómo la eficacia de estos antibióticos varía según el entorno y la dosis de exposición en cada especie. La amoxicilina, en combinación con el ácido clavulánico, está diseñada para contrarrestar la resistencia mediada por  $\beta$ -lactamasas; sin embargo, estudios han demostrado que su uso o el de las cefalosporinas en cerdos, puede seleccionar cepas de *E. coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas (Cavaco et al., 2008). Esta capacidad de selección en bacterias con potencial zoonótico subraya la necesidad de considerar cuidadosamente el uso de cefalosporinas y/o amoxicilina en animales (Cavaco et al., 2008). Por otro lado, estudios previos sugieren que la exposición diferencial a ceftazidime también es un factor crítico en la selección de resistencias (Landers et al., 2012). Los datos de este estudio concuerdan con investigaciones que evidencian un mayor riesgo de resistencia en animales de producción intensiva, como

aves y cerdos, donde el uso profiláctico de antibióticos contribuye a una presión selectiva elevada como ya se describió anteriormente (Marshall & Levy, 2011a).

Otro antibiótico evaluado fue la ciprofloxacina la cual mostró resistencia en todas las especies estudiadas, siendo del 100% en bovinos, 92.20% en aves y 96.97% en cerdos. La alta resistencia a este antibiótico es alarmante, ya que ciprofloxacina es un antimicrobiano de importancia crítica para la salud humana (OMS, 2017a). Estos hallazgos sugieren una necesidad de reevaluar su uso en la producción animal para preservar su eficacia.

Gentamicina y amikacina por otro lado presentaron bajas tasas de resistencia en todas las especies, lo que sugiere que estos antibióticos aún son efectivos en muchos casos, aunque en cerdos la resistencia a la gentamicina fue algo elevada (15.15%). Esto podría estar relacionado con la menor frecuencia de uso de estos antibióticos en la producción animal en comparación con otros fármacos (Olesen et al., 2013).

Para el caso del trimetoprim/sulfametoxazol mostró una alta resistencia en bovinos (82.19%), lo que indica una eficacia reducida de este antibiótico en esta especie. Este hallazgo coincide con estudios que han reportado resistencia a este compuesto en terneros (Tree et al., 2025).

Finalmente, colistina, un antibiótico de última línea, no presentó resistencia en bovinos, pero mostró una baja resistencia en aves y cerdos (1.37% y 7.07%, respectivamente), lo cual es consistente con la creciente preocupación global por la aparición de resistencia a la colistina en la producción animal (Kempf et al., 2013).

El análisis estadístico mediante la prueba de Chi-cuadrado reveló asociaciones significativas entre la especie animal y la resistencia a varios antibióticos, incluyendo AMC, CAZ, CRO, CN, AK, SXT y COL ( $p < 0.05$ ), lo que respalda la idea de que la especie animal es un factor relevante en la distribución de la resistencia a estos antimicrobianos. Sin embargo, ciprofloxacina no mostró una asociación estadísticamente significativa tan fuerte ( $p > 0.01$ ), lo que podría estar relacionado con la alta proporción de resistencia a este antibiótico en todas las especies estudiadas, haciendo que la variabilidad entre especies sea menos marcada.

Por otro lado, la comparación de los resultados de susceptibilidad según los criterios del CLSI 2021 frente a los del CLSI 2024 muestra una diferencia en la proporción de aislamientos clasificados como resistentes a gentamicina en todas las especies. Este

cambio no refleja una evolución en la resistencia de los microorganismos, sino una actualización en los criterios de interpretación: los mismos valores de MIC o de halo que antes se consideraban susceptibles ahora se interpretan como resistentes. Esto subraya la importancia de revisar y ajustar constantemente los puntos de corte en respuesta a los conocimientos actualizados sobre la epidemiología de la resistencia antimicrobiana y las necesidades de tratamiento en la práctica clínica.

Además, el análisis de los perfiles de resistencia en aislamientos multidrogo resistentes (MDR) reveló una mayor complejidad en cerdos y aves en comparación con los terneros, destacándose la resistencia simultánea a AMC, CAZ, CIP, CN y otros antibióticos. Este estudio demostró que el 56.6 % de los aislamientos en cerdos eran MDR, una cifra mayor en comparación con terneros (6.85 %) y aves (8.57%). La resistencia a múltiples familias de antibióticos no solo complica los enfoques de tratamiento clínico, sino que también facilita la diseminación de cepas resistentes entre poblaciones animales y humanas. Esta interconexión ha sido ampliamente documentada, mostrando que el uso de antibióticos en la producción animal, especialmente en entornos intensivos, contribuye significativamente a la selección de bacterias resistentes que pueden transmitirse a los seres humanos a través de varios medios, como alimentos contaminados, agua o incluso por contacto ambiental (Liu et al., 2024). En un estudio realizado por Hammerum et al (2014) donde compararon y caracterizaron *E. coli* productora de BLEE de muestras de cerdos y humanos que trabajaban en granjas con alto o nulo uso de C3G o C4G, se observó que la mayoría de los aislados tanto de los cerdos como de humanos fueron resistentes a dos o más de los antibióticos probados además de a las cefalosporinas, que los definen como MDR (Hammerum et al., 2014).

Si bien se observó una diferencia significativa en el número de aislamientos resistentes detectados en aves con respecto a terneros, la proporción de aislamientos MDR fue similar en ambas cadenas productivas (8.57 y 6.85% respectivamente) como ya se mencionó. Adicionalmente en ambas especies, los aislamientos resistentes se concentraron en dos perfiles de resistencia: CIP y/o CIP + SXT, representando el 92% (67/73) y el 82% (115/140) de los aislamientos en terneros y aves, respectivamente. Sin embargo, mientras que en las aves la mayoría de estos aislamientos presentaron resistencia exclusivamente a CIP 93/115 (80%), en terneros predominaron aquellos

con el perfil CIP + SXT 55/67 (82%). En un estudio realizado por Casaux et al. (2023) revela que el 77.3% de los aislamientos de *Salmonella enterica* fueron resistentes a CIP, mientras que nuestro estudio encontró perfiles resistentes predominantes a CIP y CIP + SXT en aves y terneros, lo que podría sugerir un patrón común de resistencia a quinolonas asociado a su uso en la producción animal. En este trabajo también se destaca la prevalencia de MDR en entornos de producción animal, resaltando la necesidad de implementar medidas de mitigación efectivas para reducir la diseminación de bacterias resistentes en la cadena alimentaria y proteger la salud pública (Casaux et al., 2023).

En nuestro estudio, los perfiles de resistencia más frecuentes en terneros incluyeron CIP y CIP + SXT, lo que sugiere que esta combinación de resistencia podría tener una relevancia particular en este contexto. Aunque en el estudio de *Salmonella enterica* de Casaux et al. (2023) se reportó una baja resistencia fenotípica a SXT (solo el 4% de los aislamientos fueron resistentes), el análisis molecular reveló la circulación de genes de resistencia a sulfonamidas en 29 aislamientos (38,6%), todos portadores del gen *sul2*, y dos de ellos también del gen *sul1*. Esto evidencia una alta prevalencia de resistencia exclusivamente a sulfonamidas, en contraste con la resistencia combinada a sulfonamidas y trimetoprima reportada tanto en nuestro estudio como en el de Umpierrez et al. (2017).

En este contexto, SXT parece ser un componente clave de los perfiles de MDR, junto con CIP. Esto podría indicar que en terneros los mecanismos de resistencia a quinolonas y sulfonamidas están siendo seleccionados conjuntamente, probablemente debido al uso de estos antimicrobianos en tratamientos preventivos o terapéuticos en esta especie (Cameron & McAllister, 2016).

La elevada resistencia a CIP observada en estos estudios (Casaux et al., 2023; Umpiérrez et al., 2017) subraya la urgencia de revisar su uso para prevenir la propagación de perfiles MDR que incluyan quinolonas y sulfonamidas, particularmente en terneros, donde el perfil CIP + SXT fue uno de los más frecuentes.

Cabe destacar que la regulación en el uso de fluoroquinolonas en animales de producción ha demostrado ser eficaz para reducir significativamente la aparición de bacterias resistentes. Estudios realizados en Europa evidencian que las restricciones específicas han disminuido la resistencia en bacterias patógenas de animales, contribuyendo de manera importante al control de la RAM en la cadena alimentaria (Aarestrup, 2012). Por ejemplo, en Dinamarca, la limitación en el uso de estos

antimicrobianos ha logrado reducir la resistencia en patógenos como *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. en aves y ganado (Chantziaras et al., 2014).

### 1.D Genes de resistencia transferibles a antibióticos críticos encontrados

En relación a los genes transferibles de RAM, podemos decir que este es el primer trabajo que estudió la presencia de bacterias portadoras de genes de resistencia a antimicrobianos de importancia crítica de máxima prioridad para la salud humana en tres sistemas de producción animal en Uruguay. La situación más preocupante se observó en cerdos, sistema productivo, donde un alto porcentaje de animales presentaron aislamientos resistentes, con el mayor número de genotipos bacterianos por animal y el mayor porcentaje de genes de resistencia transferibles. Teniendo en cuenta este escenario, es posible hipotetizar que, de las tres poblaciones estudiadas, el tracto digestivo porcino presenta condiciones fisiológicas más favorables para que ocurran eventos de transferencia horizontal de genes de resistencia a antimicrobianos, lo que podría verse favorecido por la mayor exposición a antibióticos en estos sistemas de producción animal (Cavaco et al., 2008). En este sentido, Van Boeckel et al. (2015) han informado que en el mundo el consumo de antibióticos por kilogramo de animal en bovinos, aves y cerdos es de 45, 148 y 172 mg, respectivamente. Nuestros resultados muestran cierto grado de correlación con ese estudio, en el sentido de que un mayor uso de antibióticos conlleva una mayor detección de mecanismos de resistencia a causa de la selectiva presión impuesta.

Sin embargo, la resistencia a colistina (al menos en este estudio) presentó valores inferiores a los reportados en otros países de nuestra región y el resto del mundo, como Ecuador, Argentina y España (García et al., 2018; Yamamoto et al., 2019).

Durante este trabajo detectamos la presencia de *E. coli* portadora de *mcr-1* en 7/50 cerdos (14%) en una misma granja. En 5/7 animales, los genes *mcr-1* y *bla<sub>CMY-2</sub>* se encontraron en aislamientos separados de *E. coli*, pero en 3 animales esos genes se encontraron dentro del mismo aislamiento. Recientemente, informamos de la detección de los primeros aislados de *E. coli* de origen humano portadores de *mcr-1* en Uruguay. Uno de estos aislamientos albergaba *bla<sub>CMY-2</sub>* y *mcr-1*, aunque en diferentes plásmidos; en este estudio, *mcr-1* fue codificado en un plásmido de tipo IncI2 (Papa-Ezdra et al., 2020). Se necesitan más estudios para determinar si existe una relación entre estos aislamientos (es decir, *mcr-1*– *bla<sub>CMY-2</sub>* con aislamientos de

origen humano y animal) o las plataformas genéticas que las codifican. Además, también encontramos un aislado obtenido de aves de corral, portador de *mcr-1*. Probablemente, la prohibición en Uruguay del uso veterinario de la colistina, en cualquiera de sus formas, tendrá efectos benéficos al reducir la presión de selección sobre microorganismos portadores de *mcr-1*. Sin embargo, teniendo en cuenta que los alelos *mcr* se asocian con frecuencia con genes que confieren resistencia a otros antibióticos ampliamente utilizados en medicina veterinaria, como quinolonas y oximiinocefalosporinas, es probable que ocurran eventos de coselección. Esto ha sido demostrado por la presencia del gen *mcr* junto con BLEE, carbapenemasas o quinolonas mediadas por plásmidos, como *qnrB* o *qnrS* en diferentes plásmidos (Incl2, IncX4, y IncHI2) (Mulvey et al., 2016; Wales & Davies, 2015).

La diseminación del gen *mcr-1* ha sido ampliamente vinculada a plásmidos del grupo de incompatibilidad Incl2, como demostraron Li et al. (2017) y Liu et al. (2018), y se evidenció en este estudio. Los investigadores destacaron la relevancia de estos plásmidos en la transferencia de resistencia a colistina en cepas de *E. coli* tanto comensales como patógenas (Li et al., 2017; Liu et al., 2018). Además, entre los complejos clonales identificados en este estudio, evidenciamos STs del complejo clonal CC10, en particular el ST10, el cual ha sido señalado en diversos trabajos como un reservorio relevante de genes de resistencia, incluyendo *mcr-1*. Por ejemplo, Migura-García et al. (2020) reportaron su asociación con aislados de origen animal, particularmente en cerdos, lo que sugiere su papel en la transmisión inter-especies (Migura-García et al., 2020). Asimismo, el ST10 ha sido hallado en infecciones extraintestinales en humanos, como señala Royer et al. (2021), lo que subraya su capacidad de adaptarse a distintos nichos ecológicos y clínicos (Royer et al., 2021).

La diversidad genética observada en la propagación de *mcr-1* en este trabajo evidenciado por la detección de diferentes secuencio-tipos (STs), como ST86 y ST184, refleja una propagación horizontal de genes de resistencia en múltiples entornos. Esta dinámica ha sido bien documentada en estudios que analizan la diseminación de *E. coli* resistente en entornos agropecuarios, como los reportados por Liu et al. (2024), lo que evidencia la complejidad de la circulación de estos genes en la interfaz humano-animal-ambiente (Liu et al., 2024).

En cuanto a la resistencia a las cefalosporinas de tercera generación y quinolonas en cerdos y aves, los genes detectados con más frecuencia fueron *bla*<sub>CTX-M-8</sub> y *bla*<sub>CMY-2</sub>, y *qnrB19*, respectivamente. Una situación similar se encontró en aislamientos de *Salmonella enterica* humana en estudios de vigilancia en nuestro país (Cordeiro et al., 2016). Este microorganismo es un patógeno primario y está asociado con episodios de gastroenterocolitis, por lo que podría actuar como puerta para genes de resistencia que circulan en agricultura y veterinaria. No obstante, la ingesta de cepas de *E. coli* que albergan el mismo u otros mecanismos de resistencia podrían pasar desapercibidas en caso de colonización intestinal asintomática. En este sentido, la colonización con *E. coli* portadora de genes de resistencia a antimicrobianos de importancia crítica podría considerarse como una zoonosis silenciosa, que contribuye al acervo genético de microorganismos resistentes presentes en el tracto gastrointestinal de los animales y humanos. Se ha observado que la colonización intestinal por cepas de *E. coli* con susceptibilidad reducida a las fluoroquinolonas pueden durar de 2 semanas a 6 meses, mientras que la presencia de *E. coli* productoras de  $\beta$ -lactamasa en pacientes ambulatorios puede durar hasta 4 meses en las heces. Por el contrario, la persistencia de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE en heces de pacientes dados de alta recientemente puede durar un promedio de 98 días (rango 14-182 días) (Oplustil et al., 2001; Treisman & Angelino, 2008).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio sobre la resistencia en *E. coli* de cerdos y aves en Uruguay reflejan patrones similares a los reportados en la región, como los hallazgos de *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>CMY-2</sub> y genes *qnr* en Brasil (Penha Filho et al., 2019). En particular, la presencia del gen *bla*<sub>CTX-M-2</sub> en un alto porcentaje de aislamientos de *Salmonella* MDR en Brasil, junto con ISCR1, sugiere un mecanismo eficiente de propagación asociado con integrones de clase 1, facilitando la diseminación de resistencia a cefalosporinas de tercera generación. La *bla*<sub>CMY-2</sub>, aunque menos frecuente en algunos aislamientos, sigue siendo relevante en la resistencia a  $\beta$ -lactámicos en animales de producción. Además, los genes *qnrB5* y *qnrB2* en *Salmonella* en Brasil, y *qnrB19* en este estudio en Uruguay, apuntan a una propagación regional de variantes del gen *qnr*, lo cual podría estar relacionado con prácticas antimicrobianas comunes. Las diferencias en la detección de AmpC entre ambos países podrían estar asociadas a variaciones en los sistemas de producción y las presiones selectivas locales (Penha Filho et al., 2019).

Entre las diversas BLEE detectadas en aves de corral también encontramos *bla*<sub>CTX-M-55</sub>. Esta  $\beta$ -lactamasa nunca había sido reportada en nuestro país; sin embargo, en nuestro país vecino, Brasil, se ha reportado tanto en aves como en humanos, generalmente asociado al gen de la enzima glutatión transferasa *fosA3*, responsable de conferir resistencia a fosfomicina (Cunha et al., 2017; Fernandes et al., 2018). Para evaluar esta probable asociación en nuestros aislados derivados de aves de corral, se realizó la búsqueda por PCR del gen *fosA3*, confirmándose su presencia.

En los resultados de este estudio en terneros, se observó una alta prevalencia del gen *qnrB19*, asociado a resistencia a quinolonas, mientras que la BLEE *bla*<sub>CTX-M-15</sub> se detectó en un solo aislamiento. Estos hallazgos coinciden con el estudio de Umpiérrez et al, (2017) en Uruguay que reportan genes similares de resistencia, como *qnrB*, *qnrS1*, y *bla*<sub>CTX-M-14</sub>. En el estudio de Umpiérrez et al, (2017), se encontraron aislamientos de *E. coli* obtenidas de muestras de bovinos con cierto grado de resistencia a las fluoroquinolonas, donde, el 7,3% eran portadoras de genes PMQR (principalmente *qnrB2* y *qnrS*) (Umpiérrez et al., 2017). En el presente trabajo, el número de aislamientos portadores de genes PMQR aumentó al 31,5% (23/73); además, detectamos un cambio en los alelos circulantes. En este sentido, el gen *qnrB19* fue el más frecuentemente encontrado, mientras que la presencia de *qnrE1* y *qnrS1* se detectó en dos y un aislamiento, respectivamente.

La detección de *qnrE1* se ha informado recientemente en aislamientos de *Salmonella enterica* del ganado en Brasil (Monte et al., 2019). Sin embargo, no ha sido descrita fuera del género *Salmonella* ni en bovinos ni en aves de corral; por lo que, en este trabajo confirmamos la circulación de dicho gen en *E. coli* tanto en bovinos como en aves de corral. El gen *qnrE1* fue reportado por primera vez en Argentina en 2017, en un aislado clínico humano de 2007 (Albornoz et al., 2017). De manera interesante, en 2011 documentamos la aparición de una variante del gen *qnrB*, denominada *qnrBKp737*, en Uruguay, identificada mediante una secuencia parcial de 606 pb obtenida por PCR (García-Fulgueiras et al., 2011). Aunque este mecanismo de resistencia ha sido poco reportado, se trata de un problema persistente en la región, que refleja la dinámica de la resistencia antimicrobiana en el contexto de “Una Salud”.

Aunque el principal mecanismo de resistencia a las oximinocefalosporinas en enterobacterias de origen humano es *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, este gen para BLEE apareció ocasionalmente en algunos de los aislamientos analizados en el presente trabajo. En Uruguay *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-8</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub> y *bla*<sub>SHV-2</sub> están entre los genes de β-lactamasa detectados con más frecuencia, principalmente en muestras de pacientes pediátricos; se necesitan más estudios para determinar si existe algún vínculo con los microorganismos detectados en este trabajo o, quizás, con las estructuras genéticas que codifican estos genes (Bado et al., 2016; Garcia-Fulgueiras et al., 2017).

Por otro lado, los ensayos de conjugación para *E. coli* resistente a CRO revelaron variabilidad en la transferencia de genes de resistencia entre especies. La falta de conjugación en terneros sugiere que los genes de resistencia podrían estar en elementos no conjugativos o cromosómicos. En contraste, la alta frecuencia de conjugación en aves (82.6%) y cerdos (92.5%) indica una notable capacidad de transferencia, con genes *bla*<sub>CTX-M</sub> y *bla*<sub>SHV</sub> presentes en plásmidos conjugativos (Bevan et al., 2017; Cavaco et al., 2008). La co-transferencia de CTX-M-55 y FosA3 en aves es especialmente preocupante, ya que potencia la multirresistencia en estos ambientes (Ho et al., 2013). Es importante mencionar que la OMS en 2017 incluyó a la fosfomicina en el grupo de 8 antibióticos de "Reserva" para ser usados como "último recurso" para casos específicos de pacientes cuando otra alternativa puede ser inadecuada o ya han fracasado otras opciones terapéuticas. Este año la Fosfomicina oral ha sido incluida en el grupo de los antibióticos de Vigilancia, dentro de la clasificación AWaRe de OMS (OMS, 2017a, 2023).

Estudios actuales resaltan que genes como *bla*<sub>CTX-M</sub> y *bla*<sub>SHV</sub> se diseminan fácilmente en entornos de producción intensiva, lo que representa un riesgo para la salud pública debido a su potencial de transmisión a humanos vía la cadena alimentaria (Ho et al., 2011). La capacidad de estos plásmidos para adaptarse a diferentes hospedadores agrava el problema, fortaleciendo la resistencia en el microbioma animal (Ho et al., 2011).

Una limitación de nuestro trabajo es el hecho de que no realizamos un estudio de factores de riesgo para determinar qué variables influyen en la selección de microorganismos resistentes. A la luz de nuestros resultados, será necesario realizar

nuevos estudios que abarcan un mayor número de establecimientos con diseño que nos permita analizar estos aspectos.

Más allá de estas limitaciones, la amplia distribución de aislados resistentes a fluoroquinolonas en los animales analizados es alarmante y puede reflejar el uso generalizado de antimicrobianos como la enrofloxacin. Dado que esta clase de antibióticos está en la lista de antimicrobianos de importancia crítica de máxima prioridad para la salud humana, su uso en medicina veterinaria debe ser drásticamente limitado.

Por último, los resultados presentados plantean interrogantes fundamentales sobre los ambientes productivos y el tratamiento de efluentes en los distintos sistemas de producción, con énfasis en el sector porcino, identificado como el más afectado por la RAM en este estudio. Este sistema muestra altas tasas de bacterias resistentes, MDR y una notable diversidad de genes de resistencia, lo que resalta la urgencia de implementar estrategias efectivas para el manejo adecuado de los efluentes generados. En este contexto, el estudio de Mencía-Ares et al. (2021) analizó explotaciones porcinas en España mediante secuenciación masiva, revelando que los perfiles de resistencia varían según el tipo de producción y microbiota (heces, purines y ambiente). Además, destacó la relación de los genes resistentes con el uso frecuente de antibióticos y el papel central de los plásmidos en su rápida y eficiente transferencia entre bacterias. Por otro lado, se sabe que, en la fertilización de suelos agrícolas, que son utilizados para la producción intensiva de alimentos para animales y humanos, es común utilizar excretas, efluentes y purines, por lo que, esta actividad ha aumentado en las tres décadas previas, ya que la producción pecuaria y agrícola orgánica se basa en el uso de biosólidos (Salazar & Alfaro, 2015). Entendiéndose por biosólidos a todos los materiales orgánicos ricos en nutrientes, que al ser aplicados al suelo se espera favorezcan la fertilidad edáfica, ya que los biosólidos recuperan la capacidad productiva de los suelos, logrando con ello una reducción en el uso de fertilizantes químicos (Alvarado et al., 2017). Por esto, para abordar la RAM en nuestros sistemas productivos, es crucial realizar estudios más profundos sobre el ambiente de efluentes y purines, lo que permitirá comprender su impacto en la propagación de la RAM y mejorar la gestión de efluentes y residuos orgánicos sólidos en estos entornos.

## POLLITOS DE UN DÍA IMPORTADOS DE BRASIL

### 2.A Enterobacterias resistentes a antibióticos críticos aisladas de pollitos de un día importados de Brasil

En 2010, el consumo mundial de antimicrobianos en sistemas de producción animal alcanzó aproximadamente 63.200 toneladas, y se proyecta que para 2030 esta cifra aumentará a 105.600 toneladas debido al crecimiento de la producción animal necesaria para satisfacer la demanda alimentaria global (Landers et al., 2012; OMS, 2014). Los países con mayor consumo de antimicrobianos en la producción animal son China, Estados Unidos y Brasil.

En Uruguay, se han implementado regulaciones para reducir el uso de antimicrobianos en la producción animal. El decreto presidencial 98/011 de 2011 prohíbe el uso de antimicrobianos como promotores de crecimiento en ganado vacuno y ovino, mientras que el decreto 141/019 de 2019 restringe completamente la comercialización de productos veterinarios con colistina.

Brasil, como uno de los principales exportadores de carne de pollo y proveedor de pollitos BB de un día, representa un posible riesgo de ingreso de MDR a otros países, incluyendo Uruguay, lo que podría evadir las políticas locales de control de RAM. Específicamente, se han reportado microorganismos resistentes en productos de pollo brasileños en distintos mercados minoristas (Casella et al., 2017).

En este estudio, los 8 embarques de pollitos de un día importados de Brasil mostraron la presencia de bacterias resistentes a al menos uno de los antibióticos de importancia crítica analizados, reflejando un panorama preocupante de RAM en bacterias provenientes de animales en etapas muy tempranas de vida. Esto implica un riesgo potencial para la diseminación de bacterias y genes de resistencia en toda la cadena de producción avícola, y sugiere que la presencia de RAM en estos embarques es un problema constante. Según una revisión realizada por Roth et al. (2019) sobre el uso de antibióticos y la RAM en *E. coli* en pollos de engorde a nivel mundial, las fluoroquinolonas, cefalosporinas de tercera generación, macrólidos y polimixinas (antibióticos "de máxima prioridad y de importancia crítica" para la medicina humana según la OMS) están aprobados para su uso en grandes regiones productoras de

aves, excepto en el caso de fluoroquinolonas en EE. UU. y cefalosporinas en la UE. Los autores destacaron que el promedio de resistencia en *E. coli* a fluoroquinolonas supera el 40% en Brasil, China y la UE, donde el uso de estos antibióticos está permitido (Roth et al., 2019).

En el análisis de aislamientos de *E. coli*, *E. cloacae* y *K. pneumoniae*, se observó una elevada frecuencia de resistencia a múltiples antibióticos de uso común y de importancia crítica. Notablemente, se registró una resistencia del 100% a la ceftriaxona en las tres especies analizadas, así como un 64% de resistencia a amoxicilina con ácido clavulánico y un 67% a la ceftazidima, entre otros antibióticos. Estos hallazgos son consistentes con un estudio realizado por Korb et al. (2015), en el que se evaluaron aislamientos de *E. coli* obtenidos de sistemas de avicultura intensiva. En ese estudio, se observó un 100% de resistencia a la ampicilina, 43% a cefotaxima, 48% a ceftriaxona, 62% a ácido nalidíxico, 23% a enrofloxacin, 23% a ciprofloxacina, 83% a tetraciclina y 45% a trimetoprim-sulfametoxazol (Korb et al., 2015).

## **2.B Genes de resistencia transferibles a antibióticos críticos encontrados y sus plataformas genéticas**

La identificación de enterobacterias portadoras de *bla*<sub>CTX-M-2</sub> o *bla*<sub>CTX-M-8</sub> y *bla*<sub>CMY-2</sub> ha sido descrito previamente para el Reino Unido y Dinamarca, en carne de pollo importada de Brasil (Rabello et al., 2020). Asimismo, se ha documentado la circulación de *bla*<sub>CTX-M-2</sub> o *bla*<sub>CMY-2</sub> en serotipos de *Salmonella* no tifoideos aisladas de aves de corral, mientras que se han detectado *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>CMY-2</sub> y *bla*<sub>CTX-M-15</sub> en aislados de *E. coli* recuperados de carcasas de pollo producidas por cuatro avicultores brasileños diferentes (Botelho et al., 2015; Penha Filho et al., 2019). Sin embargo, este es el primer reporte en Uruguay de genes de resistencia a antimicrobianos presentes en pollitos de un día de vida importados de Brasil.

Previamente, en este trabajo se describieron los resultados de los aislamientos de *E. coli* resistentes a antimicrobianos en diferentes sistemas productivos de Uruguay, incluidos los obtenidos de aves en producción de Uruguay donde se observó que más del 79% de estos aislamientos de *E. coli* presentaron resistencia a las fluoroquinolonas, mientras que el 17% mostró resistencia a las oximinocefalosporinas.

Los mecanismos de resistencia detectados en estos aislados fueron *qnrB19* y *qnrE1* para fluoroquinolonas y *bla<sub>CTX-M-2</sub>*, *bla<sub>CTX-M-8</sub>*, *bla<sub>CMY-2</sub>*, *bla<sub>CTX-M-55</sub>* y *bla<sub>SHV-2a</sub>* para oximiinocefalosporinas. Estos hallazgos permiten realizar una comparación con los resultados obtenidos en los aislamientos obtenidos de los embarques de pollitos de un día importados de Brasil.

Curiosamente, los mismos genes de resistencia (excepto *bla<sub>SHV-2a</sub>*) también fueron detectados en esta parte del estudio. Considerando que los pollitos de 1 día son transportados a las granjas de reproductores para posteriormente ser introducidos en galpones de producción que albergan miles de aves, la hipótesis que los microorganismos resistentes detectados en aves adultas se introdujeron como parte de la microbiota de pollitos de 1 día es perfectamente plausible. Sin embargo, se necesitan nuevos estudios capaces de demostrar esto.

Además, estos genes de resistencia estaban entre los más frecuentemente detectados en nuestro país en aislamientos de *Salmonella* de origen humano como ya se mencionó (Cordeiro et al., 2016). Teniendo en cuenta que *Salmonella* se considera un patógeno primario para los humanos (aunque con un ciclo de vida principalmente asociado con aves), y la cantidad de genes de resistencia detectados en los microorganismos informados en este estudio, los hallazgos de Cordeiro et al. podría ser considerado como la “punta del iceberg” en términos de transferencia de microorganismos resistentes de aves de corral a humanos.

Por otro lado, recientemente describimos las plataformas genéticas asociadas con *bla<sub>CTX-M-2</sub>* en microorganismos de origen humano (Papa-Ezdra et al., 2021). Esta BLEE está codificada principalmente en el plásmido IncC, asociados con un integrón complejo de clase 1 (In35) que presenta en su región variable los genes *aac(69)lb-bla<sub>OXA-2-orfD</sub>* (Bado et al., 2010). Estos integrones están insertados en transposones complejos derivados de Tn1696 y forman transposones híbridos (Tn7057 y Tn7058) que cuentan con tres transposasas de la familia Tn3 (Papa-Ezdra et al., 2021).

Sin embargo, en este trabajo describimos una plataforma diferente (Tn7337) codificada en un plásmido IncHI2/2A relacionado con R478 que pertenece a ST16, que, según nuestro conocimiento, no se ha reportado anteriormente. Aunque Tn7337 deriva de Tn1696, el integrón de clase 1 asociado y la aparición de IS26 entre el operón de resistencia al mercurio y tal integrón constituye un nuevo arreglo genético.

En este sentido, toma relevancia el concepto de “Una Salud” que considera a la salud humana, salud animal, la salud ambiental y la salud vegetal, como una sola. Evidenciar la aparición de genes de resistencia conocidos en nuevas plataformas genéticas, demuestra la importancia de tener en cuenta no solo la presencia de genes que confieren resistencia a los antimicrobianos, sino también la plataforma genética que moviliza tales genes, con el fin de establecer posibles vínculos entre genes de resistencia presentes en humanos, animales y el medio ambiente.

En vista de estos hallazgos, se debe dedicar más esfuerzo al estudio de los plásmidos y plataformas genéticas asociadas a *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, especialmente en aquellos casos en los que este gen codificante de una BLEE no está presente en los plásmidos IncC (García-Fulgueiras et al., 2017; Vignoli et al., 2016)

Por otro lado, también detectamos la aparición de genes de resistencia hasta el momento desconocidos en nuestro país, como el gen *rmtG* que codifica para la metilasa del ARNr 16S (que confiere alta resistencia a casi todos los aminoglucósidos) y una fosfoetanolamina transferasa codificada por el gen *mcr-9.1* (responsable de la resistencia a la colistina).

Las diversas características de pUR-EC3.2, que albergaba *bla*<sub>CTX-M-2</sub> y *mcr-9.1*, se han presentado en secciones anteriores de este informe. Hasta ahora, la aparición de alelos *mcr-9* había sido reportada en países vecinos, como Argentina (en aislados humanos) (Faccone et al., 2020) y Brasil (aislados de origen humano y animal) (Fuentes-Castillo et al., 2021). En relación con la resistencia a colistina, solo el gen *mcr-1* había sido reportado hasta el momento en Uruguay, en aislamientos de humanos (Papa-Ezdra et al., 2020); sin embargo, la llegada de otros genes *mcr* mediados por plásmidos en la microbiota de animales de producción importados como se demuestra en este trabajo, debería dar la alarma tanto en salud humana y animal. Entre los diferentes y relevantes hallazgos, también debemos señalar la presencia de *rmtG*, transportado en un pequeño plásmido IncQ1. Hasta el momento, en Uruguay solo *rmtC* había sido reportado en *Acinetobacter baumannii* (Bado et al., 2018b); sin embargo, *rmtG* ya había sido reportado en Brasil y Chile (Poirel et al., 2014). Aunque este plásmido IncQ1 carece de genes para la autotransferencia, su coexistencia (en una célula bacteriana) con plásmidos conjugativos, como IncHI2A y/o IncN2, pueden facilitar la transferencia horizontal de genes de resistencia. Considerando que este plásmido presentó secuencias Chi, y de acuerdo a lo informado previamente por

Zaman y Boles, este evento de recombinación homóloga podría haber sido mediado por enzimas RecBCD y orientado por las secuencias Chi presentes en *repC* o *mobC*, siguiendo un modelo similar al propuesto por Yau et al. (Fig. 20) (Yau et al., 2010; Zaman & Boles, 1996).

## 2.C Aislamientos secuenciados de *E. cloacae*, *K. pneumoniae* y *E. coli*

Los aislamientos ODC\_Eclo3 y ODC\_Eclo10 pertenecen a ST145 y ST32, respectivamente. ST145 ha sido implicado en brotes de infecciones hospitalarias y es notable por su resistencia a múltiples fármacos, mientras que ST32 ha demostrado ser parte de un complejo de clones que presentan resistencia a los antimicrobianos y una virulencia considerable (Chapuis et al., 2016; Hong et al., 2018). La coexistencia de varios plásmidos en estos aislamientos refuerza la idea de que la transferencia horizontal de genes de resistencia es un factor clave en la evolución y propagación de estos ST. Estos aislamientos ODC\_Eclo3 y ODC\_Eclo10, comparten un número significativo de genes de resistencia y plásmidos, resaltan la necesidad de estrategias de control más robustas para frenar la diseminación de estas bacterias multirresistentes. La capacidad de estos patógenos para adquirir y transferir genes de resistencia subraya la importancia de la vigilancia continua y la investigación para desarrollar nuevas opciones terapéuticas (Chapuis et al., 2016; Ojulong et al., 2024).

ODC\_Kpn3 pertenece al ST37, conocido por su asociación con infecciones humanas, como neumonía y bacteriemia. Este ST se ha identificado en diversas regiones del mundo y es relevante debido a su capacidad para adquirir genes de resistencia a múltiples antibióticos (Arcari et al., 2023). La diversidad genética de ST37, junto con la portación de plásmidos, sugiere que este ST puede actuar como un vector significativo en la diseminación de RAM (Arcari et al., 2023; Yang et al., 2013). Además, el aislamiento contiene varios plásmidos (IncFIB, IncN y ColE1-like) que facilitan la transferencia horizontal de genes de resistencia, un factor crucial en la propagación de resistencia (Arcari et al., 2023; del Carmen Rocha-Gracia et al., 2022; Rozwandowicz et al., 2018; Yang et al., 2013). La detección de genes de resistencia a múltiples clases de antibióticos, como aminoglucósidos,  $\beta$ -lactámicos y sulfonamidas, resalta la complejidad de las infecciones causadas por este patógeno y plantea un desafío significativo para el tratamiento (Arcari et al., 2023). La resistencia

a colistina en ODC\_Kpn3, aunque no se asocia con genes transferibles, se debe a mutaciones en reguladores como *pmrB* y *ccrB*. Estas mutaciones han sido implicadas en mecanismos de resistencia en otros estudios, sugiriendo que el monitoreo de estas variaciones podría ser esencial para entender la resistencia a colistina en el contexto clínico (Aminov et al., 2022; Anyanwu, 2021).

ODC\_Ec7 pertenece al ST224, que, según los genes de virulencia evidenciados, se clasificó como *Escherichia coli* patógena extraintestinal (ExPEC) con alto potencial zoonótico, de acuerdo con la definición propuesta por Johnson et al. (2003). Además, se identificó con el serotipo O114, el cual está vinculado a infecciones en humanos y animales, y ha sido reportado en estudios por su capacidad para causar infecciones graves y su resistencia a antibióticos de amplio espectro (Kavinesan et al., 2023; Maluta et al., 2014). Este ST224, resistente a oximinocetolinas, ya ha sido detectado en aves y mascotas, y se encuentra en hasta un 10% de los aislamientos de *E. coli* productores de BLEE asociados con infecciones del tracto urinario adquiridas en la comunidad (Cao et al., 2014; Kidsley et al., 2020).

La cepa ODC\_Ec7 alberga genes que confieren resistencia a antibióticos de primera línea, como los betalactámicos (*bla*<sub>CTX-M-55</sub>), fosfomicina (*fosA3*), trimetoprim-sulfametoxazol (*dfr12/sul3*) y quinolonas (*gyrA* [D87N y S83L], *parC* [S80I] y *parE* [S458A]). También porta varios genes que codifican colicinas y microcinas, lo que le permite competir con los microorganismos que colonizan el intestino. Como patógeno animal, ODC\_Ec7 lleva genes que confieren resistencia a antibióticos comunes en medicina veterinaria, como tetraciclina (*tetA*) y estreptomina (*aadA1/aadA2*). La prevalencia de ST224 en el entorno avícola sugiere un riesgo potencial para la salud pública, dado su potencial zoonótico y su capacidad para provocar infecciones en humanos (Ureña et al., 2023).



# CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

El presente estudio confirma la presencia de *Escherichia coli* resistente a antibióticos críticos, como ciprofloxacina, ceftriaxona y colistina, en muestras fecales de terneros, aves y cerdos en producción en Uruguay. Las proporciones de resistencia observadas son preocupantes: el 55 % de los aislamientos de terneros y hasta el 92 % de los de cerdos fueron resistentes a ciprofloxacina, mientras que el 72 % de los aislamientos de cerdos mostró resistencia a ceftriaxona. Aunque la resistencia a colistina fue baja en terneros y aves, su detección en un 14 % de los aislamientos de cerdos resulta alarmante, dado el papel crítico de este antibiótico en el tratamiento de infecciones multirresistentes en humanos.

El análisis estadístico evidenció una asociación significativa entre la especie animal y la resistencia a los antimicrobianos (RAM), lo que sugiere que las diferencias en el uso de antibióticos y las prácticas de manejo son factores determinantes en la variabilidad de los perfiles de resistencia observados. Además, se identificó una elevada proporción de aislamientos multidrogoresistentes, especialmente en cerdos, lo que no solo complica el tratamiento clínico, sino que también aumenta el riesgo de diseminación de cepas resistentes.

Estos hallazgos resaltan la urgencia de fortalecer la vigilancia y el control del uso de antibióticos en la producción animal para preservar su eficacia en salud pública. Asimismo, es fundamental continuar investigando la dinámica de la RAM en distintas especies animales, a fin de diseñar estrategias de mitigación más efectivas.

Se confirmó la presencia de aislamientos de *E. coli* con genes de resistencia transferibles a los tres antimicrobianos críticos en muestras fecales de animales de producción en Uruguay. Algunos de estos genes han sido previamente detectados en microorganismos de origen humano en el país, lo que refuerza la necesidad de abordar la RAM bajo un enfoque integral de “Una Salud”, promoviendo el uso racional de antibióticos y el fortalecimiento de los sistemas de vigilancia epidemiológica.

Asimismo, en muestras fecales de pollitos de un día importados de Brasil, se detectaron enterobacterias resistentes a antibióticos de importancia crítica para la

medicina humana. En varios casos, los determinantes de resistencia se encontraban en plásmidos poco comunes y/o en patógenos relevantes tanto para la salud humana como animal. Este hallazgo subraya la necesidad de implementar estrategias de vigilancia activa desde las primeras etapas de la cadena de producción de alimentos, a fin de evaluar y mitigar el ingreso de microorganismos multirresistentes en el sistema productivo.

El ingreso continuo de microorganismos resistentes al país podría comprometer los esfuerzos dirigidos a reducir el uso de antimicrobianos en la producción animal, limitando el impacto de las estrategias de mitigación de la RAM. En este contexto, la importación de animales portadores de microorganismos multirresistentes representa un desafío crítico, equiparable a un “caballo de Troya” moderno, que puede facilitar la diseminación de resistencia en los sistemas de producción locales.

En conjunto, estos resultados respaldan la necesidad de adoptar medidas más estrictas de monitoreo y regulación para minimizar el impacto de la RAM en la salud animal, humana y ambiental.

# PERSPECTIVAS



## PERSPECTIVAS

De los resultados obtenidos nuestras perspectivas son:

- Llevar a cabo un enfoque integral para abordar la resistencia a los antibióticos en la producción animal. Esto incluiría la realización de estudios para identificar factores de riesgo, como prácticas de manejo y uso de antibióticos, en diversos establecimientos, lo que permitiría implementar medidas de control y prevención específicas. Además, se propone establecer un programa de vigilancia a largo plazo que rastree las tendencias de resistencia en distintas especies animales, incluyendo el muestreo regular de animales y productos de origen animal, así como la recopilación de datos sobre el uso de antibióticos.
- realizar investigaciones en alternativas a los antibióticos, como bacteriófagos, probióticos y fitoterapéuticos, también es esencial para reducir la dependencia de estos medicamentos y minimizar la selección de cepas resistentes. Recientemente, se ha iniciado un proyecto sobre el uso de probióticos en la producción de aves.
- implementar programas de educación y capacitación para productores y veterinarios sobre el uso responsable de antimicrobianos, así como llevar a cabo campañas de sensibilización para informar al público sobre la resistencia a los antibióticos y su impacto en la salud pública.
- realizar estudios que evalúen la dinámica de los microorganismos resistentes importados, como los pollitos de un día, y sus implicaciones en la salud pública, lo que podría ayudar a incluir protocolos de control y vigilancia desde el punto de entrada de los animales importados.

# BIBLIOGRAFÍA



## BIBLIOGRAFÍA

- Aarestrup, F. (2012). Sustainable farming: Get pigs off antibiotics. *Nature*, 486(7404), 465–466. <https://doi.org/10.1038/486465A>
- Abd M, Ahmed E, Zhong L, Shen C, Yang Y, Doi Y, Tian G. (2020). *Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000-2019)*. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1754133>
- Aboushady, A. T., Suján, M. J., Pham, K., Clark, A., Marks, F., Holm, M., Joh, H. S., Poudyal, N., & Stelling, J. (2023). Key recommendations for antimicrobial resistance surveillance: Takeaways from the CAPTURA project. *Clinical Infectious Diseases*, 77(Supplement\_7), S581–S587. <https://doi.org/10.1093/cid/ciad487>
- Agersø, Y., Aarestrup, F. M., Pedersen, K., Seyfarth, A. M., Struve, T., & Hasman, H. (2012). Prevalence of extended-spectrum cephalosporinase (ESC)-producing *Escherichia coli* in Danish slaughter pigs and retail meat identified by selective enrichment and association with cephalosporin usage. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(3), 582–588. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKR507>
- AGEV (GABINETE PRODUCTIVO). (2009). *Cadenas de valor (II) : bio y nanotecnología, av.. Catálogo en línea*. AGEV (GABINETE PRODUCTIVO). [https://pmb.parlamento.gub.uy/pmb/opac\\_css/index.php?lvl=notice\\_display&id=64645](https://pmb.parlamento.gub.uy/pmb/opac_css/index.php?lvl=notice_display&id=64645)
- Albornoz, E., Tijet, N., De Belder, D., Gomez, S., Martino, F., Corso, A., Melano, R. G., & Petroni, A. (2017). QnrE1, a member of a new family of plasmid-located quinolone resistance genes, originated from the chromosome of enterobacter species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(5). <https://doi.org/10.1128/AAC.02555-16>
- Aldred, K. J., Kerns, R. J., & Osheroff, N. (2014). *Mechanism of Quinolone Action and Resistance*. <https://doi.org/10.1021/bi5000564>
- Alonso, C. A., González-Barrio, D., Tenorio, C., Ruiz-Fons, F., & Torres, C. (2016). Antimicrobial resistance in faecal *Escherichia coli* isolates from farmed red deer and wild small mammals. Detection of a multiresistant *E. coli* producing extended-spectrum beta-lactamase. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 45, 34–39. <https://doi.org/10.1016/J.CIMID.2016.02.003>
- Alvarado Ibarra, J., Aguilar Gastelum, I., Nubes Ortiz, G., & Velázquez Contreras, L. E. (2017). CONTAMINACIÓN POTENCIAL POR BIOSÓLIDOS DEPOSITADOS EN UN CAMPO DEPORTIVO. <https://www.redalyc.org/pdf/6729/672971091002.pdf>
- Ambler, R. P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 289(1036), 321–331. <https://doi.org/10.1098/RSTB.1980.0049>
- Aminov, R., Mora, A., Es, A. M., Quesada, A., & Campos, M. J. (2022). Editorial: Zoonotic Microorganisms and Spread of Acquired Polymyxin Resistance Determinants. *Frontiers in Microbiology*, 13, 849316. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.849316>
- Andersson M, & MacGowan A. (2003). Development of the quinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg212>
- Andes, D., Craig, W., Nielsen, L. A., & Kristensen, H. H. (2009). In vivo pharmacodynamic characterization of a novel plectasin antibiotic, NZ2114, in a murine infection model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(7), 3003–3009. <https://doi.org/10.1128/AAC.01584-08>
- Anyanwu MU, Okpala COR, Chah KF, Shoyinka VS. (2021). *Prevalence and Traits of Mobile Colistin Resistance Gene Harboring Isolates from Different Ecosystems in Africa*. - EBSCO. <https://doi.org/10.1155/2021/6630379>
- Arcari, G., Polani, R., Bruno, F., Capitani, V., Sacco, F., Menichincheri, G., Raponi, G., & Carattoli, A. (2023). *Ceftazidime-avibactam resistance in Klebsiella pneumoniae sequence type 37: a decade of persistence and concealed evolution*. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000931>
- Bado, I., Cordeiro, N. F., Robino, L., García-Fulgueiras, V., Seija, V., Bazet, C., Gutkind, G., Ayala, J. A., & Vignoli, R. (2010). Detection of class 1 and 2 integrons, extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and qnr alleles in enterobacterial isolates from the digestive tract of Intensive Care Unit inpatients. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(5), 453–458. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.06.042>

- Bado, I., Gutiérrez, C., García-Fulgueiras, V., Cordeiro, N. F., Araújo Pirez, L., Seija, V., Bazet, C., Rieppi, G., & Vignoli, R. (2016). CTX-M-15 in combination with aac(6')-Ib-cr is the most prevalent mechanism of resistance both in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, including *K. pneumoniae* ST258, in an ICU in Uruguay. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 6, 5–9. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.02.001>
- Bado, I., Papa-Ezdra, R., Cordeiro, N., Outeda, M., Caiata, L., García-Fulgueiras, V., Seija, V., & Vignoli, R. (2018a). Detection of qnrVC6, within a new genetic context, in an NDM-1-producing *Citrobacter freundii* clinical isolate from Uruguay. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 14, 95–98. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.02.023>
- Bado, I., Papa-Ezdra, R., Delgado-Blas, J. F., Gaudio, M., Gutiérrez, C., Cordeiro, N. F., García-Fulgueiras, V., Araújo Pirez, L., Seija, V., Medina, J. C., Rieppi, G., Gonzalez-Zorn, B., & Vignoli, R. (2018b). Molecular characterization of carbapenem-resistant *acinetobacter baumannii* in the intensive care unit of Uruguay's University hospital identifies the first rmtC gene in the species. *Microbial Drug Resistance*, 24(7), 1012–1019. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0300>
- Balcázar, J. L., Blas, I. de, Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., & Múzquiz, J. L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114(3–4), 173–186. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.01.009>
- Ball, P. (2003). Adverse drug reactions: implications for the development of fluoroquinolones. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51 Suppl 1(SUPPL. 1), 21–27. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKG209>
- Barlow, M., Reik, R. A., Jacobs, S. D., Medina, M., Meyer, M. P., McGowan, J. E., & Tenover, F. C. (2008). High Rate of Mobilization for blaCTX-Ms. *Emerging Infectious Diseases*, 14(3), 423. <https://doi.org/10.3201/EID1403.070405>
- Baron, S., Hadjadj, L., Rolain, J. M., & Olaitan, A. O. (2016). Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 48(6), 583–591. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.06.023>
- Barton M, Parviainen A, & Norton N. (2004). Polymyxin B protects against induced endotoxaemia in vivo. *EQUINE VETERINARY JOURNAL*, 397–401. <https://doi.org/10.2746/0425164044868350>
- Bell, W., Carballo, C., Castro, G., & Barlocco, N. (2014). *Jornadas Nacionales de Actualización Porcina y VI Encuentro del CIAP: Situación y perspectivas de la producción porcina en Uruguay*. Recuperado de <https://www.upc.edu.uy/caracterizacion-socio-economica-del-sector-porcino?download=168:bell-y-col-2014>
- Bennett, N., Bentancur, A., Fernandez, F., & Kurioka, M. (2017). *Plan Nacional de contención de la Resistencia Antimicrobiana de Uruguay*. [https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/documentos/noticias/plan\\_nacional\\_de\\_contencion\\_de\\_la\\_resistencia\\_antimicrobiana\\_de\\_uruguay.pdf](https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/documentos/noticias/plan_nacional_de_contencion_de_la_resistencia_antimicrobiana_de_uruguay.pdf)
- Bennett, P. M. (2004). Genome Plasticity. *Genomics, Proteomics, and Clinical Bacteriology*, 71–113. <https://doi.org/10.1385/1-59259-763-7:071>
- Bevan, E. R., Jones, A. M., & Hawkey, P. M. (2017). Global epidemiology of CTX-M  $\beta$ -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(8), 2145–2155. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKX146>
- Blanco, M., Blanco, J. E., Alonso, M. P., & Blanco, J. (1996). Virulence factors and O groups of *Escherichia coli* isolates from patients with acute pyelonephritis, cystitis and asymptomatic bacteriuria. *European Journal of Epidemiology*, 12(2), 191–198. <https://doi.org/10.1007/BF00145506>
- Bonnet, R. (2004). Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(1), 1–14. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.1-14.2004>
- Borowiak, M., Fischer, J., Hammerl, J. A., Hendriksen, R. S., Szabo, I., & Malorny, B. (2017a). Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, mcr-5, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(12), 3317–3324. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx327>
- Borowiak, M., Fischer, J., Hammerl, J. A., Hendriksen, R. S., Szabo, I., & Malorny, B. (2017b). Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, mcr-5, conferring colistin

- resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(12), 3317–3324. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKX327>
- Bortolaia, V., Kaas, R. S., Ruppe, E., Roberts, M. C., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon, A., Allesoe, R. L., Rebelo, A. R., Florensa, A. F., Fagelhauer, L., Chakraborty, T., Neumann, B., Werner, G., Bender, J. K., Stingl, K., Nguyen, M., Coppens, J., Xavier, B. B., ... Aarestrup, F. M. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(12), 3491. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAA345>
- Botelho, L. A. B., Kraychete, G. B., e Silva, J. L. C., Regis, D. V. V., Picão, R. C., Moreira, B. M., & Bonelli, R. R. (2015). Widespread distribution of CTX-M and plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* from Brazilian chicken meat. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(2), 249–254. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140389>
- Bradford, P. A. (2001). Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), 933. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.933-951.2001>
- Brisson-Noel, A., Arthur, M., & Courvalin, P. (1988). Evidence for natural gene transfer from gram-positive cocci to *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 170(4), 1739–1745. <https://doi.org/10.1128/JB.170.4.1739-1745.1988>
- Brown, S. A. (1996). Fluoroquinolones in animal health. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 19(1), 1–14. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2885.1996.TB00001.X>
- Bryskier, A. (2014). Antibiotics and Antibacterial Agents: Classifications and Structure-Activity Relationship. *Antimicrobial Agents*, 13–38. <https://doi.org/10.1128/9781555815929.CH2>
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2016).  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(8). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A025247>
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969–976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
- Bush, K., Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. (1995). MINIREVIEW A Functional Classification Scheme for Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 39(6), 1211–1233. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.6.1211>
- Callens, B., Persoons, D., Maes, D., Laanen, M., Postma, M., Boyen, F., Haesebrouck, F., Butaye, P., Catry, B., & Dewulf, J. (2012). Prophylactic and metaphylactic antimicrobial use in Belgian fattening pig herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 106(1), 53–62. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2012.03.001>
- Cameron, A., & McAllister, T. A. (2016). Antimicrobial usage and resistance in beef production. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 2016 7:1, 7(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/S40104-016-0127-3>
- Cantón, R., González-Alba, J. M., & Galán, J. C. (2012). CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Frontiers in Microbiology*, 3(APR), 110. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2012.00110>
- Cao, X., Zhang, Z., Shen, H., Ning, M., Chen, J., Wei, H., & Zhang, K. (2014). Genotypic characteristics of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates associated with urinary tract infections. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 122(11), 1088–1095. <https://doi.org/10.1111/APM.12260>
- Carattoli, A., & Hasman, H. (2020). PlasmidFinder and In Silico pMLST: Identification and Typing of Plasmid Replicons in Whole-Genome Sequencing (WGS). *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2075, 285–294. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9877-7\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9877-7_20)
- Carattoli, A., Villa, L., Feudi, C., Curcio, L., Orsini, S., Luppi, A., Pezzotti, G., & Magistrali, C. F. (2017). Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. 1–5. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30589>
- Carretto, E., Brovarone, F., Nardini, P., Russello, G., Barbarini, D., Pongolini, S., Gagliotti, C., Carattoli, A., & Sarti, M. (2018). Detection of *mcr-4* positive *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in clinical isolates of human origin, Italy, October to November 2016. *Eurosurveillance*, 23(2). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.2.17-00821>
- Carver, T., Berriman, M., Tivey, A., Patel, C., Böhme, U., Barrell, B. G., Parkhill, J., & Rajandream, M. A. (2008). Artemis and ACT: viewing, annotating and comparing sequences stored in a relational database.

- Casaux, M. L., D'Alessandro, B., Vignoli, R., & Fraga, M. (2023). Phenotypic and genotypic survey of antibiotic resistance in *Salmonella enterica* isolates from dairy farms in Uruguay. *Frontiers in Veterinary Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2023.1055432/FULL>
- Casella, T., Cerdeira, L. T., Fernandes, M. R., Souza, T. A., Haenni, M., Madec, J. Y., Lincopan, N., & Nogueira, M. C. L. (2017). Draft genome sequence of a CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST345 from commercial chicken meat in Brazil. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 9, 124–125. <https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2017.04.002>
- Cassini, A., Högberg, L. D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G. S., Colomb-Cotinat, M., Kretzschmar, M. E., Devleeschauwer, B., Cecchini, M., Ouakrim, D. A., Oliveira, T. C., Struelens, M. J., Suetens, C., Monnet, D. L., Strauss, R., Mertens, K., Struyf, T., Catry, B., ... Hopkins, S. (2019). Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *The Lancet. Infectious Diseases*, 19(1), 56–66. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30605-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30605-4)
- Catry, B., Cavaleri, M., Baptiste, K., Grave, K., Grein, K., Holm, A., Jukes, H., Liebana, E., Navas, A. L., Mackay, D., Magiorakos, A. P., Romo, M. A. M., Moulin, G., Madero, C. M., Pomba, M. C. M. F., Powell, M., Pyörälä, S., Rantala, M., Ružauskas, M., ... Edo, J. T. (2015). Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46(3), 297–306. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2015.06.005>
- Cavaco, L. M., Abatih, E., Aarestrup, F. M., & Guardabassi, L. (2008). Selection and Persistence of CTX-M-Producing *Escherichia coli* in the Intestinal Flora of Pigs Treated with Amoxicillin, Ceftiofur, or Cefquinome. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 52(10), 3612–3616. <https://doi.org/10.1128/AAC.00354-08>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2013). *ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS in the United States*. <https://www.cdc.gov/antimicrobial-resistance/media/pdfs/ar-threats-2013-508.pdf>
- Chantziaras, I., Boyen, F., Callens, B., & Dewulf, J. (2014). Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(3), 827–834. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKT443>
- Chapuis, A., Amoureux, L., Bador, J., Gavalas, A., Siebor, E., Chrétien, M. L., Caillot, D., Janin, M., De Curraize, C., & Neuwirth, C. (2016). Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase Producing *Enterobacter cloacae* with high MICs of quaternary ammonium compounds in a hematology ward associated with contaminated sinks. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUL), 191384. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.01070/BIBTEX>
- Chaudhry, S. B., Veve, M. P., & Wagner, J. L. (2019). Cephalosporins: A Focus on Side Chains and  $\beta$ -Lactam Cross-Reactivity. *Pharmacy: Journal of Pharmacy Education and Practice*, 7(3), 103. <https://doi.org/10.3390/PHARMACY7030103>
- Chen, X., Zhang, W., Pan, W., Yin, J., Pan, Z., Gao, S., & Jiao, X. (2012). Prevalence of qnr, aac(6')-Ib-cr, qepA, and oqxAB in *Escherichia coli* isolates: Discovery Service para Timbó. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012 June, 56(6), 3423–3427. <https://doi.org/10.1128/AAC.06191-11>
- Cheng K, Wilkinson M, Chaban Y, Wigley DB. 2020. A conformational switch in response to Chi converts RecBCD from phage destruction to DNA repair. *Nat Struct Mol Biol* 27:71–77. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0355-2>
- Che, Y., Wu, R., Li, H., Wang, L., Wu, X., Chen, Q., Chen, R., & Zhou, L. (2023). Characterization of two novel colistin resistance gene mcr-1 variants originated from *Moraxella* spp. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1153740. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1153740/BIBTEX>
- Christine Årdal, A., Findlay, D., Savic, M., Carmeli, Y., Gyssens, I., Laxminarayan, R., Outterson, K., Rex, J. H., Årdal, C., Ciabuschi, F., Hackett, J., Harbarth, S., Hermsen, E., Knirsch, C., Mahoney, N., Murillo, N., Theuretzbacher, U., Baraldi, E., Bettiol, E., ... Temkin and, L. (2018). *DRIVE-AB Steering Committee members*. [www.imi.europa.eu/projects-results/project-factsheets/drive-ab](http://www.imi.europa.eu/projects-results/project-factsheets/drive-ab)

- CLSI. (2021). *CLSI 2021- Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. Clinical and Laboratory Standards Institute. [https://clsi.org/media/z2uhcbmv/m100ed31\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/z2uhcbmv/m100ed31_sample.pdf)
- CLSI. (2024). *CLSI M100 ED34\_2024. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>
- Cohen, M. L. (1992). Epidemiology of Drug Resistance: Implications for a Post—Antimicrobial Era. *Science*, 257(5073), 1050–1055. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.257.5073.1050>
- Collin, F., Karkare, S., & Maxwell, A. (2011). Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(3), 479–497. <https://doi.org/10.1007/S00253-011-3557-Z>
- Cordeiro, N. F., Nabón, A., García-Fulgueiras, V., Álvez, M., Sirok, A., Camou, T., & Vignoli, R. (2016). Analysis of plasmid-mediated quinolone and oxyimino-cephalosporin resistance mechanisms in Uruguayan *Salmonella enterica* isolates from 2011–2013. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 6, 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.06.002>
- Cunha, M. P. V., Lincopan, N., Cerdeira, L., Esposito, F., Dropa, M., Franco, L. S., Moreno, A. M., & Knöbl, T. (2017). Coexistence of CTX-M-2, CTX-M-55, CMY-2, FosA3, and QnrB19 in Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* from Poultry in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(4). <https://doi.org/10.1128/AAC.02474-16>
- DANMAP. (2023). *Report Highlights 2023: Antimicrobial consumption in animals*. <https://www.danmap.org/reports/2023/kap-4>
- Darphorn, T. S., Bel, K., Koenders-van Sint Anneland, B. B., Brul, S., & Ter Kuile, B. H. (2021). Antibiotic resistance plasmid composition and architecture in *Escherichia coli* isolates from meat. *Scientific Reports 2021 11:1*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81683-w>
- de Avila e Silva, S., Echeverrigaray, S., & Gerhardt, G. J. L. (2011). BacPP: bacterial promoter prediction—a tool for accurate sigma-factor specific assignment in enterobacteria. *Journal of Theoretical Biology*, 287(1), 92–99. <https://doi.org/10.1016/J.JTBI.2011.07.017>
- del Carmen Rocha-Gracia, R., Lozano-Zarain, P., Cázarez, Z. G., Alonso, C. A., Brambila, E., Torres, C., & Cortés-Cortés, G. (2022). IncFIB plasmids carrying the resistance gene blaCTX-M-15 in ESBL-producing *Escherichia coli* clones from pediatric patients. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 16(03), 500–506. <https://doi.org/10.3855/jidc.15080>
- DePestel, D. D., Benninger, M. S., Danziger, L., LaPlante, K. L., May, C., Luskin, A., Pichichero, M., & Hadley, J. A. (2008). Cephalosporin use in treatment of patients with penicillin allergies. *Journal of the American Pharmacists Association*, 48(4), 530–540. <https://doi.org/10.1331/JAPHA.2008.07006>
- DIEA - MGAP. (2007). *LA PRODUCCIÓN LECHERA EN EL URUGUAY*. <http://www2.mgap.gub.uy/portal/afiledownload.aspx?2,5,104,O,S,0,216%3BS%3B9%3B40>
- DIEA - MGAP. (2021). *Anuario Estadístico Agropecuario 2021 de la DIEA*. <https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2021/LIBRO%20ANUARIO%202021%20Web.pdf>
- DIEA - MGAP. (2023). *26a edición del Anuario Estadístico Agropecuario del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP), realizado por la Oficina de Estadísticas Agropecuarias (DIEA)*. <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/anuario-estadistico-agropecuaria-2023>
- Doi, Y., & Chambers, H. F. (2014). Penicillins and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 1, 263–277. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00020-5>
- Doi, Y., Iovleva, A., & Bonomo, R. A. (2017). The ecology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in the developed world. *Journal of Travel Medicine*, 24(suppl\_1). <https://doi.org/10.1093/JTM/TAW102>
- Domagala, J. M. (1994). Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 33(4), 685–706. <https://doi.org/10.1093/JAC/33.4.685>
- Dominguez, J. E., Faccone, D., Tijet, N., Gomez, S., Corso, A., Fernández-Miyakawa, M. E., & Melano, R. G. (2019). Characterization of *Escherichia coli* carrying mcr-1 plasmids recovered from food animals from

- Argentina. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9(MAR), 443454. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2019.00041/BIBTEX>
- EMA. (2009). REVISED REFLECTION PAPER ON THE USE OF 3rd AND 4th GENERATION CEPHALOSPORINS IN FOOD PRODUCING ANIMALS IN THE EUROPEAN UNION: DEVELOPMENT OF RESISTANCE AND IMPACT ON HUMAN AND ANIMAL HEALTH. *J Vet Pharmacol Ther.* 2009 Dec;32(6):515-33. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2009.01075.x>
- EMA. (2010). *Sales of veterinary antimicrobial agents in 19 EU/EEA countries - Second ESVAC report.* <https://www.europeansources.info/record/sales-of-veterinary-antimicrobial-agents-in-19-eu-eea-countries-in-2010-second-esvac-report/>
- EMA. (2016). *European Medicines Agency (EMA) Antimicrobial Expert Group (AMEG) Classification of WHO Critically Important Antimicrobials (CIAs) based on degree of risk to humans due to antimicrobial resistance development following use in animals.* <https://www.gov.uk/government/publications/veterinary-antimicrobial-resistance-and-sales-7E5BFOA33493/ASSETS/GRAPHIC/JCM.01555-19-F0001.JPEG>
- Escalante, E. G., Condor, K. Y., Di Conza, J. A., & Gutkind, G. O. (2020). Phenotypic detection of plasmid-mediated colistin resistance in Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(3). <https://doi.org/10.1128/JCM.01555-19/ASSET/4E86112A-E084-4162-ADD3-7E5BFOA33493/ASSETS/GRAPHIC/JCM.01555-19-F0001.JPEG>
- Faccione, D., Martino, F., Albornoz, E., Gomez, S., Corso, A., & Petroni, A. (2020). Plasmid carrying mcr-9 from an extensively drug-resistant NDM-1-producing *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* clinical isolate. *Infection, Genetics and Evolution*, 81. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2020.104273>
- Famiglietti, A., Quinteros, M., Vázquez, M., Marín, M., Nicola, F., Radice, M., Galas, M., Pasterán, F., Bantar, C., Casellas, J. M., Kovensky Pupko, J., Couto, E., Goldberg, M., Lopardo, H., Gutkind, G., & Soloaga, R. (2005). Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en Enterobacteriaceae. *Revista Argentina de Microbiología*, 37(1), 57–66. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15991480/>
- FAO. (2023). *Boletín de la FAO sobre “Una sola salud”.* <https://www.fao.org/one-health/es>
- Fernandes, M. R., Moura, Q., Sartori, L., Silva, K. C., Cunha, M. P., Esposito, F., Lopes, R., Otutumi, L. K., Gonçalves, D. D., Dropa, M., Matté, M. H., Monte, D. F., Landgraf, M., Francisco, G. R., Bueno, M. F., de Oliveira Garcia, D., Knöbl, T., Moreno, A. M., & Lincopan, N. (2016). Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the mcr-1 gene. *Euro Surveillanc e : Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 21(17). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.17.30214>
- Fernandes, M. R., Sellera, F. P., Moura, Q., Souza, T. A., & Lincopan, N. (2018). Draft genome sequence of a CTX-M-8, CTX-M-55 and FosA3 co-producing *Escherichia coli* ST117/B2 isolated from an asymptomatic carrier. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 12, 183–184. <https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2018.01.015>
- Fraser, D. (2006). *El bienestar animal y la intensificación de la producción animal Una interpretación alternativa.* <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/1a54737f-6989-47cf-a1fb-9c1941eae039/content>
- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., & Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(9), 722–732. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO1235>
- Fuentes-Castillo, D., Sellera, F. P., Goldberg, D. W., Fontana, H., Esposito, F., Cardoso, B., Ikeda, J., Kyllar, A., Catão-Dias, J. L., & Lincopan, N. (2021). Colistin-resistant *Enterobacter kobei* carrying mcr-9.1 and blaCTX-M-15 infecting a critically endangered franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*), Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(6), 3048–3054. <https://doi.org/10.1111/TBED.13980>
- Gao, Y., Lu, C., Shen, D., Liu, J., Ma, Z., Yang, B., Ling, W., & Waigi, M. G. (2019). Elimination of the risks of colistin resistance gene (mcr-1) in livestock manure during composting. *Environment International*, 126, 61–68. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2019.02.015>
- García-Fulgueiras, V., Bado, I., Mota, M. I., Robino, L., Cordeiro, N. F., Varela, A., Algorta, G., Gutkind, G., Ayala, J. A., & Vignoli, R. (2011). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance in enterobacterial clinical isolates in the paediatric hospital of Uruguay. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(8), 1725–1729. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKR222>

- García-Fernández, A., & Carattoli, A. (2010). Plasmid double locus sequence typing for IncHI2 plasmids, a subtyping scheme for the characterization of IncHI2 plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamase and quinolone resistance genes. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(6), 1155–1161. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKQ101>
- García-Fulgueiras, V., Araujo, L., Bado, I., Cordeiro, N. F., Mota, M. I., Laguna, G., Algorta, G., & Vignoli, R. (2017). Allodemic distribution of plasmids co-harboring blaCTX-M-15/aac(6′)-Ib-cr/qnrB in *Klebsiella pneumoniae* is the main source of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Uruguay’s paediatric hospital. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 9, 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.01.008>
- García-Fulgueiras, V., Zapata, Y., Papa-Ezdra, R., Ávila, P., Caiata, L., Seija, V., Rojas Rodríguez, A. E., Magallanes, C., Márquez Villalba, C., & Vignoli, R. (2020). First characterization of *K. pneumoniae* ST11 clinical isolates harboring blaKPC-3 in Latin America. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(3), 211–216. <https://doi.org/10.1016/J.RAM.2019.10.003>
- García, V., García-Meniño, I., Mora, A., Flament-Simon, S. C., Díaz-Jiménez, D., Blanco, J. E., Alonso, M. P., & Blanco, J. (2018). 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). *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(1), 104–108. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2018.03.022>
- Gardner, P., Smith, D. H., Beer, H., & Moellering, R. C. (1969). Recovery of resistance (R) factors from a drug-free community. *Lancet (London, England)*, 2(7624), 774–776. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(69\)90482-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(69)90482-6)
- Gelband Hellen, Miller-Petrie Molly, Pantsu Suraj, Gandra Manth, Levinson Jordan, Barter Devra, White Andrea, Laxminarayan Ramanan. (2015). *THE STATE OF THE WORLD’S ANTIBIOTICS 2015*. [www.cddep.org](http://www.cddep.org)
- González A; Bauza R. (2009). *Producción porcina en Uruguay*. [http://pigtrop.cirad.fr/FichiersComplementaires/RCPP164/164\\_01artAGonz%C3%A1lezOK.pdf](http://pigtrop.cirad.fr/FichiersComplementaires/RCPP164/164_01artAGonz%C3%A1lezOK.pdf)
- GuíaVET. (2021). *Vademécum de especialidades veterinarias. Uruguay*. <https://guiavet.uy/>
- Guo, Q., Ding, B., Jové, T., Stoesser, N., Cooper, V. S., Wang, M., & Doi, Y. (2016). Characterization of a Novel IncHI2 Plasmid Carrying Tandem Copies of blaCTX-M-2 in a fosA6-Harboring *Escherichia coli* Sequence Type 410 Strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(11), 6742. <https://doi.org/10.1128/AAC.01173-16>
- Guyonnet, J., Manco, B., Baduel, L., Kaltsatos, V., Aliabadi, M. H. F. S., & Lees, P. (2010). Determination of a dosage regimen of colistin by pharmacokinetic/pharmacodynamic integration and modeling for treatment of G.I.T. disease in pigs. *Research in Veterinary Science*, 88(2), 307–314. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2009.09.001>
- Hall, R. M., & Collis, C. M. (1998). Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug Resistance Updates*, 1(2), 109–119. [https://doi.org/10.1016/S1368-7646\(98\)80026-5](https://doi.org/10.1016/S1368-7646(98)80026-5)
- Hammerum, A. M., Larsen, J., Andersen, V. D., Lester, C. H., Skytte, T. S. S., Hansen, F., Olsen, S. S., Mordhorst, H., Skov, R. L., Aarestrup, F. M., & Agersø, Y. (2014). Characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* obtained from Danish pigs, pig farmers and their families from farms with high or no consumption of third- or fourth-generation cephalosporins. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(10), 2650–2657. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKU180>
- Hamon, A., Bastides, F., & Lefort, A. (2021). Betalactámicos. *EMC - Tratado de Medicina*, 25(2), 1–7. [https://doi.org/10.1016/S1636-5410\(21\)45119-6](https://doi.org/10.1016/S1636-5410(21)45119-6)
- Hansen, L. H., Jensen, L. B., Sørensen, H. I., & Sørensen, S. J. (2007). Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(1), 145–147. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKM167>
- Hasman, H., Hammerum, A. M., Hansen, F., Hendriksen, R. S., Olesen, B., Agersø, Y., Zankari, E., Leekitcharoenphon, P., Stegger, M., Kaas, R. S., Cavaco, L. M., Hansen, D. S., Aarestrup, F. M., & Skov, R. L. (2015). Detection of mcr-1 encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015. *Eurosurveillance*, 20(49), 1–5. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2015.20.49.30085/CITE/REFWORKS>

- Hassoun-Kheir, N., Stabholz, Y., Kreft, J. U., de la Cruz, R., Romalde, J. L., Nesme, J., Sørensen, S. J., Smets, B. F., Graham, D., & Paul, M. (2020). Comparison of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes abundance in hospital and community wastewater: A systematic review. *Science of The Total Environment*, 743, 140804. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.140804>
- Hawkey. (1998). *The origins and molecular basis of antibiotic resistance*. [www.bmj.com](http://www.bmj.com)
- Hawkins, Boothe, Guinn, Aucoin, & Ngyuen. (1998). Concentration of enrofloxacin and its active metabolite in alveolar macrophages and pulmonary epithelial lining fluid of dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 21(1), 18–23. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2885.1998.00103.X>
- Hong, Y. K., Lee, J. Y., & Ko, K. S. (2018). Colistin resistance in Enterobacter spp. isolates in Korea. *Journal of Microbiology*, 56(6), 435–440. <https://doi.org/10.1007/S12275-018-7449-0/METRICS>
- Ho, P. L., Chan, J., Lo, W. U., Law, P. Y., Li, Z., Lai, E. L., & Chow, K. H. (2013). Dissemination of plasmid-mediated fosfomycin resistance fosA3 among multidrug-resistant Escherichia coli from livestock and other animals. *Journal of Applied Microbiology*, 114(3), 695–702. <https://doi.org/10.1111/JAM.12099>
- Ho, P. L., Chow, K. H., Lai, E. L., Lo, W. U., Yeung, M. K., Chan, J., Chan, P. Y., & Yuen, K. Y. (2011). Extensive dissemination of CTX-M-producing Escherichia coli with multidrug resistance to ‘critically important’ antibiotics among food animals in Hong Kong, 2008–10. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(4), 765–768. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKQ539>
- Hornish, R., & Katariski, S. (2005). Cephalosporins in Veterinary Medicine - Ceftiofur Use in Food Animals. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2(7), 717–731. <https://doi.org/10.2174/1568026023393679>
- Husna, A., Rahman, M. M., Badruzzaman, A. T. M., Sikder, M. H., Islam, M. R., Rahman, M. T., Alam, J., & Ashour, H. M. (2023). Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases (ESBL): Challenges and Opportunities. *Biomedicines*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES11112937>
- Jacoby, G. A. (2003). ANTIMICROBIAL-RESISTANT PATHOGENS IN THE 1990s. <https://doi.org/10.1146/Annurev.Med.47.1.169>, 47, 169–179. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MED.47.1.169>
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC B-Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 161–182. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08>
- Jiang, X., Yin, Z., Yin, X., Fang, H., Sun, Q., Tong, Y., Xu, Y., Zhang, D., Feng, J., Chen, W., Song, Y., Wang, J., Chen, S., & Zhou, D. (2017). Sequencing of blaIMP carrying IncN2 plasmids, and comparative genomics of IncN2 plasmids harboring class 1 integrons. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(MAR), 102. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2017.00102/FULL>
- Johnson, J. R., Kuskowski, M. A., Owens, K., Gajewski, A., & Winokur, P. L. (2003). Phylogenetic origin and virulence genotype in relation to resistance to fluoroquinolones and/or extended-spectrum cephalosporins and cephamycins among Escherichia coli isolates from animals and humans. *The Journal of Infectious Diseases*, 188(5), 759–768. <https://doi.org/10.1086/377455>
- Johnson, J. R., & Stell, A. L. (2000). Extended Virulence Genotypes of Escherichia coli Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(1), 261–272. <https://doi.org/10.1086/315217>
- KAARTINEN, L., SALONEN, M., ÄLLI, L., & PYÖRÄLÄ, S. (1995). Pharmacokinetics of enrofloxacin after single intravenous, intramuscular and subcutaneous injections in lactating cows. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 18(5), 357–362. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2885.1995.TB00604.X>
- Kahlmeter, G., & Singh, N. (2017). GLOBAL PRIORITY LIST OF ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA TO GUIDE RESEARCH, DISCOVERY, AND DEVELOPMENT OF NEW ANTIBIOTICS. [http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf](http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf)
- Karlowsky, J. A., Adam, H. J., Baxter, M. R., Lagacé-Wiens, P. R. S., Walkty, A. J., Hoban, D. J., & Zhanel, G. G. (2013). In Vitro Activity of Ceftaroline-Avibactam against Gram-Negative and Gram-Positive Pathogens Isolated from Patients in Canadian Hospitals from 2010 to 2012: Results from the CANWARD Surveillance Study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(11), 5600. <https://doi.org/10.1128/AAC.01485-13>
- Kavinesan, K., Sugumar, G., Chrisolite, B., Muthiahsethupathy, A., Sudarshan, S., Parthiban, F., & Mansoor, M. (2023). Phenotypic and genotypic characterization of pathogenic Escherichia coli identified in

- resistance mapping of  $\beta$ -lactam drug-resistant isolates from seafood along Tuticorin coast. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(26), 68111–68128. <https://doi.org/10.1007/S11356-023-27008-Y/FIGURES/7>
- Kawahara, S., Utsunomiya, C., Ishikawa, S., & Sekiguchi, J. (1997). Purification and characterization of an autolysin of *Bacillus polymyxa* var. *colistin* which is most active at acidic pH. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83(5), 419–422. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)82994-7](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)82994-7)
- Kempf, I., Fleury, M. A., Drider, D., Bruneau, M., Sanders, P., Chauvin, C., Madec, J. Y., & Jouy, E. (2013). What do we know about resistance to colistin in Enterobacteriaceae in avian and pig production in Europe? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 42(5), 379–383. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2013.06.012>
- Kidsley, A. K., White, R. T., Beatson, S. A., Saputra, S., Schembri, M. A., Gordon, D., Johnson, J. R., O’Dea, M., Mollinger, J. L., Abraham, S., & Trott, D. J. (2020). Companion Animals Are Spillover Hosts of the Multidrug-Resistant Human Extraintestinal *Escherichia coli* Pandemic Clones ST131 and ST1193. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.01968>
- Kieffer, N., Nordmann, P., Moreno, A. M., Moreno, L. Z., Chaby, R., Breton, A., Tissières, P., & Poirel, L. (2019). Genetic and Functional Characterization of an MCR-3-Like Enzyme-Producing *Escherichia coli* Isolate Recovered from Swine in Brazil. <https://doi.org/10.1128/AAC.00278-18>
- Kobayashi, S., Kuzuyama, T., & Seto, H. (2000). Characterization of the *fomA* and *fomB* Gene Products from *Streptomyces wedmorensis*, Which Confer Fosfomycin Resistance on *Escherichia coli*. 44(3), 647–650. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.3.647-650.2000>
- Kolmogorov, M., Yuan, J., Lin, Y., & Pevzner, P. A. (2019). Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nature Biotechnology* 2019 37:5, 37(5), 540–546. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0072-8>
- Korb, A., De Nazareno, E. R., Costa, L. D., Da, K., Nogueira, S., Dalsenter, P. R., Tuon, F. F. B., & Pomba, M. C. (2015). Tipagem molecular e resistência aos antimicrobianos em isolados de *Escherichia coli* de frangos de corte e de tratadores na Região Metropolitana de Curitiba, Paraná 1. *Pesq. Vet. Bras*, 35(3), 2015. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015000300008>
- Landers, T. F., Cohen, B., Wittum, T. E., & Larson, E. L. (2012). A Review of Antibiotic Use in Food Animals: Perspective, Policy, and Potential. <https://doi.org/10.1177/003335491212700103>
- Larsen, M. V., Cosentino, S., Rasmussen, S., Friis, C., Hasman, H., Lykke, R., Jelsbak, L., Sicheritz-Pontén, T., Ussery, D. W., Aarestrup, F. M., & Lund, O. (2012). *Multilocus Sequence Typing of Total-Genome-Sequenced Bacteria*. <https://doi.org/10.1128/JCM.06094-11>
- Laxminarayan, R., Van Boeckel, T., Teillant, A., Laxminarayan, R., & Van Boeckel, T. (2015). *The Economic Costs of Withdrawing Antimicrobial Growth Promoters from the Livestock Sector*. <https://doi.org/10.1787/5js64kst5wvl-en>
- Lekshmi, M., Ammini, P., Kumar, S., & Varela, M. F. (2017). The Food Production Environment and the Development of Antimicrobial Resistance in Human Pathogens of Animal Origin. *Microorganisms*, 5(1), 11. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS5010011>
- Li, J., Nation, R. L., Turnidge, J. D., Milne, R. W., Coulthard, K., Rayner, C. R., & Paterson, D. L. (2006). Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infectious Diseases*, 6(9), 589–601. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70580-1/ASSET/OA67C069-F1EB-46B0-8B88-B23030170570/MAIN.ASSETS/GR4.SML](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70580-1/ASSET/OA67C069-F1EB-46B0-8B88-B23030170570/MAIN.ASSETS/GR4.SML)
- Ling, Z., Yin, W., Shen, Z., Wang, Y., Shen, J., & Walsh, T. R. (2020). Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(11), 3087–3095. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAA205>
- Li, R., Xie, M., Zhang, J., Yang, Z., Liu, L., Liu, X., Zheng, Z., Chan, E. W. C., & Chen, S. (2017). Genetic characterization of *mcr-1*-bearing plasmids to depict molecular mechanisms underlying dissemination of the colistin resistance determinant. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(2), 393–401. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKW411>
- Liu, C., Sun, S., Sun, Y., Li, X., Gu, W., Luo, Y., Wang, N., & Wang, Q. (2024). Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from food and clinical environment in China from 2001 to 2020. *Science of The Total Environment*, 939, 173498. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2024.173498>

- Liu, H., Zhu, B., Liang, B., Xu, X., Qiu, S., Jia, L., Li, P., Yang, L., Li, Y., Xiang, Y., Xie, J., Wang, L., Yang, C., Sun, Y., & Song, H. (2018). A novel mcr-1 variant carried by an IncI2-Type plasmid identified from a multidrug resistant enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 9(APR), 364979. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.00815/FULL-SUPLELEMENTARY-MATERIAL>
- Liu, J. H., Deng, Y. T., Zeng, Z. L., Gao, J. H., Chen, L., Arakawa, Y., & Chen, Z. L. (2008). Coprevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants QepA, Qnr, and AAC(6')-Ib-cr among 16S rRNA Methylase RmtB-Producing *Escherichia coli* Isolates from Pigs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(8), 2992. <https://doi.org/10.1128/AAC.01686-07>
- Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L. F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J. H., & Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2), 161–168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
- Liu, Y. Y., Chandler, C. E., Leung, L. M., McElheny, C. L., Mettus, R. T., Shanks, R. M. Q., Liu, J. H., Goodlett, D. R., Ernst, R. K., & Doi, Y. (2017). Structural Modification of Lipopolysaccharide Conferred by mcr-1 in Gram-Negative ESKAPE Pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(6). <https://doi.org/10.1128/AAC.00580-17>
- Livermore, D. M. (2008). Defining an extended-spectrum beta-lactamase. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14 Suppl 1(SUPPL. 1), 3–10. <https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2007.01857.X>
- Llosa, M., & De La Cruz, F. (2005). Bacterial conjugation: A potential tool for genomic engineering. In *Research in Microbiology* (Vol. 156, Issue 1, pp. 1–6). <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.07.008>
- Long C; Morales C; Racz G. (2011). *Estrategias competitivas en las empresas del sector avícola en el Uruguay*. [https://www.researchgate.net/publication/314512846\\_Estrategias\\_competitivas\\_desarrolladas\\_por\\_la\\_industria\\_avicola\\_de\\_la\\_Costa\\_del\\_Rio\\_Uruguay\\_CRU\\_Entre\\_Rios\\_Argentina](https://www.researchgate.net/publication/314512846_Estrategias_competitivas_desarrolladas_por_la_industria_avicola_de_la_Costa_del_Rio_Uruguay_CRU_Entre_Rios_Argentina)
- López, H. S. (1993). Quinolonas y fluoroquinolonas en medicina veterinaria. *Veterinaria México*, 24(2), 83–92. <https://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-1993/vm932a.pdf>
- Lupski, J. R. (1987). Molecular mechanisms for transposition of drug-resistance genes and other movable genetic elements. *Reviews of Infectious Diseases*, 9(2), 357–368. <https://doi.org/10.1093/CLINIDS/9.2.357>
- Macesic, N., Blakeway, L. V., Stewart, J. D., Hawkey, J., Wyres, K. L., Judd, L. M., Wick, R. R., Jenney, A. W., Holt, K. E., & Peleg, A. Y. (2021). Silent spread of mobile colistin resistance gene on IncHI2 ‘superplasmids’ in clinical carbapenem-resistant Enterobacterales. *Clinical Microbiology and Infection*, 27(12), 1856.e7-1856.e13. <https://doi.org/10.1016/J.CMI.2021.04.020>
- Madigan, M. T. , M. J. M. , P. J. , & G. F. M. (2004). *BROCK BIOLOGIA DE LOS MICROORGANISMOS (10ª ED.) | MICHAEL MADIGAN*. <https://www.casadellibro.com/libro-brock-biologia-de-los-microorganismos-10-ed/9788420536798/926664>
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2011.03570.X>
- Maluta, R. P., Logue, C. M., Casas, M. R. T., Meng, T., Guastalli, E. A. L., Rojas, T. C. G., Montelli, A. C., Sadatsune, T., Ramos, M. D. C., Nolan, L. K., & Silveira, W. D. Da. (2014). Overlapped Sequence Types (STs) and Serogroups of Avian Pathogenic (APEC) and Human Extra-Intestinal Pathogenic (ExPEC) *Escherichia coli* Isolated in Brazil. *PLoS ONE*, 9(8), 1–10. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0105016>
- Marchandin, H., Carriere, C., Sirot, D., Jean-Pierre, H., & Darbas, H. (1999). TEM-24 Produced by Four Different Species of Enterobacteriaceae, Including *Providencia rettgeri*, in a Single Patient.

- Marshall, B. M., & Levy, S. B. (2011). Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), 718. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-11>
- Martínez-Martínez, L., Pascual, A., & Jacoby, G. A. (1998). Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*, 351(9105), 797–799. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)07322-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)07322-4)
- Martínez Rojas, D. D. V. (2009). Betalactamasas tipo AmpC: Generalidades y métodos para detección fenotípica. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29(2), 78–83. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562009000200003&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562009000200003&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Martins, E. R., Bueno, M. F. C., Francisco, G. R., Casella, T., de Oliveira Garcia, D., Cerdeira, L. T., Gerber, A. L., de Almeida, L. G. P., Lincopan, N., de Vasconcelos, A. T. R., Nogueira, M. C. L., & Estofolete, C. F. (2020). Genome and plasmid context of two rmtG-carrying Enterobacter hormaechei isolated from urinary tract infections in Brazil. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 20, 36–40. <https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2019.06.020>
- Mather, A. E., Matthews, L., Mellor, D. J., Reeve, R., Denwood, M. J., Boerlin, P., Reid-Smith, R. J., Brown, D. J., Coia, J. E., Browning, L. M., Haydon, D. T., & Reid, S. W. J. (2011). An ecological approach to assessing the epidemiology of antimicrobial resistance in animal and human populations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1733), 1630. <https://doi.org/10.1098/RSPB.2011.1975>
- McEwen, S. A., & Collignon, P. J. (2018). Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiology Spectrum*, 6(2). <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.ARBA-0009-2017>
- Medeiros, A. A. (1997). Evolution and Dissemination of  $\beta$ -Lactamases Accelerated by Generations of  $\beta$ -Lactam Antibiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 24(Supplement\_1), S19–S45. [https://doi.org/10.1093/CLINIDS/24.SUPPLEMENT\\_1.S19](https://doi.org/10.1093/CLINIDS/24.SUPPLEMENT_1.S19)
- Mehlhorn, A. J., & Brown, D. A. (2007). Safety concerns with fluoroquinolones. *The Annals of Pharmacotherapy*, 41(11), 1859–1866. <https://doi.org/10.1345/APH.1K347>
- Mejía, R. J., Sosa, L. F. G., López, J. A. A., & Lara, P. D. L. (2017). Caracterización molecular de Escherichia coli resistente a antibióticos aislada de mastitis bovina en Michoacán, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8(4), 387–396. <https://doi.org/10.22319/RMCP.V8I4.4251>
- Mencía-Ares, Ó., Urueña, A. M. C., Fernández, H. P., García, M. G., Pérez, L. P., Ordóñez, A. Á., ... Rodríguez, H. A. (2021). Radiografiando al enemigo: resistencias a los antibióticos en granja. Cuáles, dónde y por qué. *Suis*, (175), 10-16. [https://www.ivis.org/sites/default/files/library/suis/175/Suis175\\_1.pdf](https://www.ivis.org/sites/default/files/library/suis/175/Suis175_1.pdf)
- MGAP. (2006). *Encuesta porcina 2006, caracterización de la situación productiva, tecnológica, comercial y social del sector porcino (FPTA- 170)*. <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/2020-02/porcinos2006.pdf>
- MGAP. (2011). *Decreto 98/011 Prohibición del uso de antibióticos en la alimentación para animales ovinos y bovinos | MGAP*. <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/institucional/normativa/decreto-98011-prohibicion-del-uso-antibioticos-alimentacion-para-animales>
- MGAP. (2015). *Resolución N° 193/015 A de DGSG: Regulación de las condiciones de comercialización y uso de antibióticos y antimicrobianos para animales | Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca*. <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/institucional/normativa/resolucion-n-193015-dgsg-regulacion-condiciones-comercializacion-uso>
- MGAP. (2017). *URUGUAY AGROINTELIGENTE. LOS DESAFÍOS PARA UN DESARROLLO SOSTENIBLE*. <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/2019-12/libro%20completo%20con%20hipervinculos.pdf>
- MGAP. (2019). *Decreto N° 141/019*. <https://www.impo.com.uy/bases/decretos/141-2019>
- Migura-García, L., González-López, J. J., Martínez-Urtaza, J., Aguirre Sánchez, J. R., Moreno-Mingorance, A., Pérez de Rozas, A., Höfle, U., Ramiro, Y., & Gonzalez-Escalona, N. (2020). mcr-Colistin Resistance Genes Mobilized by IncX4, IncHI2, and IncI2 Plasmids in Escherichia coli of Pigs and White Stork in Spain. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.03072>

- Monte, D. F., Lincopan, N., Cerdeira, L., Fedorka-Cray, P. J., & Landgraf, M. (2019). Early dissemination of qnrE1 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from livestock in South America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(9), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/aac.00571-19>
- Moore, J. N., & Barton, M. H. (2003). Treatment of endotoxemia. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 19(3), 681–695. <https://doi.org/10.1016/J.CVEQ.2003.08.006>
- Moreno, L. Z., Gomes, V. T. M., Moreira, J., de Oliveira, C. H., Peres, B. P., Silva, A. P. S., Thakur, S., La Ragione, R. M., & Moreno, A. M. (2019). First report of mcr-1-harboring *Salmonella enterica* serovar Schwarzengrund isolated from poultry meat in Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 93(4), 376–379. <https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2018.10.016>
- Mulvey, M. R., Mataseje, L. F., Robertson, J., Nash, J. H. E., Boerlin, P., Toyne, B., Irwin, R., & Melano, R. G. (2016). Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. *The Lancet. Infectious Diseases*, 16(3), 289–290. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00067-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00067-0)
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet (London, England)*, 399(10325), 629. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Murray, P. R., Baron, E. J., Tenover, J. C., & Tenover, F. C. (2003). *Manual of clinical microbiology* (8th ed.). Washington, DC: ASM Press.
- Naas, T., Poirel, L., & Nordmann, P. (2008). Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14 Suppl 1(SUPPL. 1), 42–52. <https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2007.01861.X>
- Naber, K. G., & Adam, D. (1998). Classification of fluoroquinolones. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 10(4), 255–257. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(98\)00059-4](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(98)00059-4)
- Nasrollahian, S., Graham, J. P., & Halaji, M. (2024). A review of the mechanisms that confer antibiotic resistance in pathotypes of *E. coli*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14, 1387497. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2024.1387497/BIBTEX>
- Navarro, F., Calvo, J., Cantón, R., Fernández-Cuenca, F., & Mirelis, B. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 29, Issue 7, pp. 524–534). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.011>
- Navarro, F., Miró, E., & Mirelis, B. (2010). Interpretive reading of enterobacteria antibiograms. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(9), 638–645. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.05.002>
- Nordmann, P., & Poirel, L. (2005). Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, 463–469. <https://doi.org/10.1093/jac/dki245>
- OECD. (2018). *Stemming the Superbug Tide*. <https://doi.org/10.1787/9789264307599-EN>
- OIE. (2019). *LISTA DE AGENTES ANTIMICROBIANOS IMPORTANTES PARA LA MEDICINA VETERINARIA* (Vol. 33). [https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Our\\_scientific\\_expertise/docs/pdf/AMR/E\\_OIE\\_Lista\\_antimicrobianos\\_Julio2019.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/E_OIE_Lista_antimicrobianos_Julio2019.pdf)
- Ojulong, J., Gebru, G. N., Duduyemi, B., Gbenda, E., Janneh, M. L., Sharty, J., Monteiro, L., Kowuor, D., Ameh, S., & Ogbuanu, I. U. (2024). Prevalence of Antimicrobial Resistance in *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, and *Escherichia coli* Isolates among Stillbirths and Deceased Under-Five Children in Sierra Leone: Data from the Child Health and Mortality Prevention Surveillance Sites from 2019 to 2022. *Microorganisms* 2024, Vol. 12, Page 1657, 12(8), 1657. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS12081657>
- Olaitan, A. O., Morand, S., & Rolain, J. M. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 5(NOV), 643. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2014.00643>

- Olesen, S. W., Lipsitch, M., Grad, Y. H., & Feldman, M. W. (2013). The role of “spillover” in antibiotic resistance. *PNAS*, 117(46), 29063–29068. <https://doi.org/10.1073/pnas.2013694117/-DCSupplemental>
- OMS. (2014). *ANTIMICROBIAL RESISTANCE Global Report on Surveillance*. [https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748\\_eng.pdf?sequence=1](https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf?sequence=1)
- OMS. (2017a). *Critically Important Antimicrobials for Human Medicine 5th Revision 2016 Ranking of medically important antimicrobials for risk management of antimicrobial resistance due to non-human use*. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/255027/9789241512220-eng.pdf?sequence=1>
- OMS. (2017b). *PLAN DE ACCIÓN MUNDIAL SOBRE LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS*. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/255204/9789243509761-spa.pdf>
- OMS. (2017c). *Sistema mundial de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos Manual para la primera fase de implementación*. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/253135/9789243549408-spa.pdf?sequence=1>
- OMS. (2022). *El enfoque de “Una Salud”*. <https://www.woah.org/es/que-hacemos/iniciativas-mundiales/una-sola-salud/>
- OMS. (2021). *Declaración conjunta tripartita (FAO, OIE, OMS) y PNUMA La tripartita y el PNUMA apoyan la definición de “Una Salud” de la OHHLEP*. <https://www.who.int/es/news/item/01-12-2021-tripartite-and-uneep-support-ohhlep-s-definition-of-one-health>
- OMS. (2023). *Guía AWaRe ( AccesoAcceso, , PrecauciónPrecaución y y ReservaReserva) de la ) de la OMS para el uso de antibióticosOMS para el uso*. <http://www.wipo.int/amc/es/mediation/rules/>
- O’Neill. (2016). *TACKLING DRUG-RESISTANT INFECTIONS GLOBALLY: FINAL REPORT AND RECOMMENDATIONS THE REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE CHAIRED*. [https://amr-review.org/sites/default/files/160525\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf)
- ONU. (2016). *71º Asamblea General de la ONU. Declaración política de jefes de estado que se comprometieron a adoptar una estrategia de amplio alcance y coordinada para abordar las causas fundamentales de la RAM en múltiples sectores, en especial en la salud humana, la salud animal y la agricultura y brindaron apoyo al Plan de Acción Mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos*. ONU. <https://documents.un.org/doc/undoc/gen/n16/310/69/pdf/n1631069.pdf>
- Oplustil, C. P., Nunes, R., & Mendes, C. (2001). Multicenter evaluation of resistance patterns of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp and *Shigella* spp isolated from clinical specimens in Brazil: RESISTNET surveillance program. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 5(1), 8–12. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702001000100002>
- Osborn, A. M., & Böltner, D. (2002). When phage, plasmids, and transposons collide: Genomic islands, and conjugative- and mobilizable-transposons as a mosaic continuum. *Plasmid*, 48(3), 202–212. [https://doi.org/10.1016/S0147-619X\(02\)00117-8](https://doi.org/10.1016/S0147-619X(02)00117-8)
- Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G. D., Olsen, G. J., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Parrello, B., Shukla, M., Vonstein, V., Wattam, A. R., Xia, F., & Stevens, R. (2014). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue). <https://doi.org/10.1093/NAR/GKT1226>
- Pallecchi, L., Bartoloni, A., Riccobono, E., Fernandez, C., Mantella, A., Magnelli, D., Mannini, D., Strohmeyer, M., Bartalesi, F., Rodriguez, H., Gotuzzo, E., & Rossolini, G. M. (2012). *Quinolone Resistance in Absence of Selective Pressure: The Experience of a Very Remote Community in the Amazon Forest*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001790>
- Papa-Ezdra, R., Cordeiro, N. F., Di Pilato, V., Chiarelli, A., Pallecchi, L., Garcia-Fulgueiras, V., & Vignoli, R. (2021). Description of novel resistance islands harbouring blaCTX-M-2 in IncC type 2 plasmids. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 26, 37–41. <https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2021.03.031>
- Papa-Ezdra, R., Grill Diaz, F., Vieytes, M., García-Fulgueiras, V., Caiata, L., Ávila, P., Brasesco, M., Christophersen, I., Cordeiro, N. F., Algorta, G., Galiana, A., & Vignoli, R. (2020). First three *Escherichia coli* isolates harbouring mcr-1 in Uruguay. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 20, 187–190. <https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2019.07.016>
- Pardon, B., Catry, B., Dewulf, J., Persoons, D., Hostens, M., De bleecker, K., & Deprez, P. (2012). Prospective study on quantitative and qualitative antimicrobial and anti-inflammatory drug use in white veal

- calves. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(4), 1027–1038. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKR570>
- Partridge, S. R., Brown, H. J., Stokes, H. W., & Hall, R. M. (2001). Transposons Tn1696 and Tn21 and Their Integrons In4 and In2 Have Independent Origins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4), 1263. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1263-1270.2001>
- Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: A clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 657–686. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>
- Penha Filho, R. A. C., Ferreira, J. C., Kanashiro, A. M. I., Berchieri Junior, A., & Darini, A. L. da C. (2019). Emergent multidrug-resistant nontyphoidal Salmonella serovars isolated from poultry in Brazil coharboring blaCTX-M-2 and qnrB or blaCMY-2 in large plasmids. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 95(1), 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.04.003>
- Perez, F., Rudin, S. D., Marshall, S. H., Coakley, P., Chen, L., Kreiswirth, B. N., Rather, P. N., Hujer, A. M., Toltzis, P., Van Duin, D., Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2013). OqxAB, a Quinolone and Olaquinox Efflux Pump, Is Widely Distributed among Multidrug-Resistant Klebsiella pneumoniae Isolates of Human Origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(9), 4602. <https://doi.org/10.1128/AAC.00725-13>
- Peterson, L. R. (2001). Quinolone Molecular Structure-Activity Relationships: What We Have Learned about Improving Antimicrobial Activity. *Clinical Infectious Diseases*, 33(3), 180–186. [https://academic.oup.com/cid/article/33/Supplement\\_3/S180/301182](https://academic.oup.com/cid/article/33/Supplement_3/S180/301182)
- Poirel, L., Labarca, J., Bello, H., Rioseco, M. L., Bernabeu, S., & Nordmann, P. (2014). Emergence of the 16S rRNA methylase RmtG in an extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing and colistin-resistant Klebsiella pneumoniae isolate in Chile. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(1), 618–619. <https://doi.org/10.1128/AAC.02059-13>
- Poirel, L., Larpin, Y., Dobias, J., Stephan, R., Decousser, J. W., Madec, J. Y., & Nordmann, P. (2018). Rapid Polymyxin NP test for the detection of polymyxin resistance mediated by the mcr-1/mcr-2 genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 90(1), 7–10. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.09.012>
- Prescott, J. F. (2008). Antimicrobial use in food and companion animals. *Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*, 9(2), 127–133. <https://doi.org/10.1017/S1466252308001473>
- Pucci, M. J., & Bush, K. (2013). *Investigational Antimicrobial Agents of 2013*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00033-13>
- Rabello, R. F., Bonelli, R. R., Penna, B. A., Albuquerque, J. P., Souza, R. M., & Cerqueira, A. M. F. (2020). Antimicrobial Resistance in Farm Animals in Brazil: An Update Overview. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/ANI10040552>
- Rebello, A. R., Bortolaia, V., Kjeldgaard, J. S., Pedersen, S. K., Leekitcharoenphon, P., Hansen, I. M., Guerra, B., Malorny, B., Borowiak, M., Hammerl, J. A., Battisti, A., Franco, A., Alba, P., Perrin-Guyomard, A., Granier, S. A., De Frutos, C., Escobar, Malhotra-Kumar, S., Villa, L., ... Hendriksen, R. S. (2018). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes. *Eurosurveillance*, 23(6), 17–00672. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672>
- Recchia, G. D., & Hall, R. M. (1997). Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. *Trends in Microbiology*, 5(10), 389–394. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(97\)01123-2](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(97)01123-2)
- Rhouma, M., Beaudry, F., Thériault, W., & Letellier, A. (2016). Colistin in pig production: Chemistry, mechanism of antibacterial action, microbial resistance emergence, and one health perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 7(NOV), 1789. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.01789/BIBTEX>
- Rice, L. B. (2008). Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(8), 1079–1081. <https://doi.org/10.1086/533452>
- Rice, W. R., & Chippindale, A. K. (2001). Sexual Recombination and the Power of Natural Selection. *Science*, 294(5542), 555–559. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1061380>

- Rittschof, C. C., & Robinson, G. E. (2013). Manipulation of colony environment modulates honey bee aggression and brain gene expression. *Genes, Brain, and Behavior*, 12(8), 802–811. <https://doi.org/10.1111/gbb.12087>
- Rivas, K., Rivas, M., Dávila, E., & Rodríguez, M. (2002). Cefalosporinas: De la Primera a la Cuarta Generación. *Revista de La Facultad de Medicina*, 25(2), 142–153. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-04692002000200003&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04692002000200003&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Robicsek, A., Jacoby, G. A., & Hooper, D. C. (2006). The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *The Lancet. Infectious Diseases*, 6(10), 629–640. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70599-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70599-0)
- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Sahm, D. F., Jacoby, G. A., & Hooper, D. C. (2006). qnr prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(8), 2872–2874. <https://doi.org/10.1128/AAC.01647-05>
- Robino, L., García-Fulgueiras, V., Araujo, L., Algorta, G., Pérez, M. C., & Vignoli, R. (2014). Urinary tract infection in Uruguayan children: Aetiology, antimicrobial resistance and uropathogenic Escherichia coli virulotyping. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2(4), 293–298. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2014.08.003>
- Rodríguez-Martínez, J. M., de Alba, P. D., Briales, A., Machuca, J., Lossa, M., Fernández-Cuenca, F., Baño, J. R., Martínez-Martínez, L., & Pascual, Á. (2013). Contribution of OqxAB efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum-β-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(1), 68–73. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKS377>
- Rodríguez-Martínez, J. M., Machuca, J., Cano, M. E., Calvo, J., Martínez-Martínez, L., & Pascual, A. (2016). Plasmid-mediated quinolone resistance: Two decades on. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 29, 13–29. <https://doi.org/10.1016/J.DRUP.2016.09.001>
- Ron, E. Z. (2010). Distribution and evolution of virulence factors in septicemic Escherichia coli. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(6), 367–370. <https://doi.org/10.1016/J.IJMM.2010.04.009>
- Roth, N., Käsbohrer, A., Mayrhofer, S., Zitz, U., Hofacre, C., & Domig, K. J. (2019). The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in Escherichia coli: A global overview. *Poultry Science*, 98, 1791–1804. <https://doi.org/10.3382/ps/pey539>
- Royer, G., Darty, M. M., Clermont, O., Condamine, B., Laouenan, C., Decousser, J. W., Vallenet, D., Lefort, A., de Lastours, V., Denamur, E., Wolff, M., Alavoine, L., Duval, X., Skurnik, D., Woerther, P. L., Andremont, A., Carbonnelle, E., Lortholary, O., Nassif, X., ... Basse, B. (2021). Phylogroup stability contrasts with high within sequence type complex dynamics of Escherichia coli bloodstream infection isolates over a 12-year period. *Genome Medicine*, 13(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/S13073-021-00892-0/FIGURES/7>
- Rozwandowicz, M., Brouwer, M., Fischer, J., Wagenaar, J. A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., Mevius, D. J., & Hordijk, J. (2018). *Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae*. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx488>
- Ruggiero, M., Curto, L., Brunetti, F., Sauvage, E., Galleni, M., Power, P., & Gutkind, G. (2017). Impact of mutations at Arg220 and Thr237 in PER-2 β-Lactamase on conformation, activity, and susceptibility to inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(6). <https://doi.org/10.1128/AAC.02193-16>
- Saga, T., Sabtcheva, S., Mitsutake, K., Ishii, Y., Tateda, K., Yamaguchi, K., & Kaku, M. (2013). Characterization of qnrB-Like Genes in Citrobacter Species of the American Type Culture Collection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(6), 2863. <https://doi.org/10.1128/AAC.02396-12>
- Salazar, F & Alfaro, M. (2015). “Tratamientos para reducir la carga de patógenos en purines”, en Salazar, F. & Alfaro, M. Buenas prácticas ganaderas para reducir la carga de patógenos en purines (27-42). México: Instituto de Investigaciones Agropecuarias. <https://bibliotecadigital.ciren.cl/server/api/core/bitstreams/12642774-0049-45ee-ad5a-51a5b2354784/content>
- Sato, T., Yokota, S. I., Uchida, I., Okubo, T., Ishihara, K., Fujii, N., & Tamura, Y. (2011). A fluoroquinolone-resistant Escherichia coli clinical isolate without quinolone resistance-determining region mutations

- found in Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(8), 3964–3965. <https://doi.org/10.1128/AAC.00532-11>
- Seija, V., Medina Presentado, J. C., Bado, I., Papa Ezdra, R., Batista, N., Gutierrez, C., Guirado, M., Vidal, M., Nin, M., & Vignoli, R. (2015). Sepsis caused by new delhi metallo- $\beta$ -lactamase (blaNDM-1) and qnrD-producing *Morganella morganii*, treated successfully with fosfomicin and meropenem: Case report and literature review. *International Journal of Infectious Diseases*, 30, e20–e26. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.09.010>
- Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P., Rolain, J. M., & Raoult, D. (2009). Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clinical Infectious Diseases*, 49(4), 543–551. <https://doi.org/10.1086/600885>
- Sergio Mella, M., Claudia Zemelman, M., Helia Bello, T., Mariana Dominguez, Y., Gerardo Gonzalez, R., & Raul Zemelman, Z. (2001). Propiedades microbiológicas, clasificación y relación estructura-actividad de cefalosporinas e importancia de las cefalosporinas de cuarta generación. *Revista Chilena de Infectología*, 18(1), 7–19. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182001000100002>
- Silbergeld, E. K., Graham, J., & Price, L. B. (2008). Industrial Food Animal Production, Antimicrobial Resistance, and Human Health. <https://doi.org/10.1146/Annurev.Publhealth.29.020907.090904>, 29, 151–169. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PUBLHEALTH.29.020907.090904>
- Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
- Sullivan, M. J., Petty, N. K., & Beatson, S. A. (2011). Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 27(7), 1009–1010. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTR039>
- Swaminathan, B., Barrett, T. J., Hunter, S. B., & Tauxe, R. V. (2001). PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 7(3), 382–389. <https://doi.org/10.3201/EID0703.010303>
- Tansirichaiya, S., Rahman, M. A., & Roberts, A. P. (2019). The Transposon Registry. *Mobile DNA*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/S13100-019-0182-3>
- Taylor, D. E., Gibreel, A., Lawley, T. D., & Tracz, D. M. (2004). Antibiotic Resistance Plasmids. *Plasmid Biology*, 473–491. <https://doi.org/10.1128/9781555817732.CH23>
- Terveer, E. M., Nijhuis, R. H. T., Crobach, M. J. T., Knetsch, C. W., Veldkamp, K. E., Gooskens, J., Kuijper, E. J., & Claas, E. C. J. (2017). Prevalence of colistin resistance gene (mcr-1) containing Enterobacteriaceae in feces of patients attending a tertiary care hospital and detection of a mcr-1 containing, colistin susceptible *E. coli*. *PLoS ONE*, 12(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178598>
- Torrades S. (2001). *Uso y abuso de los antibióticos | Offarm*. Elsevier . <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-resumen-uso-abuso-los-antibioticos-13018370>
- Torres, C., & Zarazaga, M. (2007). BLEE en animales y su importancia en la transmisión a humanos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clín. (Ed. Impr.)*, 25(supl.2), 29–37. <https://ibecs.isciii.es/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=IBECS&lang=e&nextAction=Ink&exprSearch=177537&indexSearch=ID>
- Toussaint, A., & Merlin, C. (2002). Mobile Elements as a Combination of Functional Modules. *Plasmid*, 47(1), 26–35. <https://doi.org/10.1006/PLAS.2001.1552>
- Tran, J. H., & Jacoby, G. A. (2002). Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(8), 5638. <https://doi.org/10.1073/PNAS.082092899>
- Tran, J. H., Jacoby, G. A., & Hooper, D. C. (2005). Interaction of the Plasmid-Encoded Quinolone Resistance Protein QnrA with *Escherichia coli* Topoisomerase IV. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), 3050. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.3050-3052.2005>
- Tree, M., Lam, T. J. G. M., McDougall, S., Beggs, D. S., Robertson, I. D., Barnes, A. L., ... & Aleri, J. W. (2025). Epidemiology of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* from healthy dairy cattle on a Mediterranean pasture-based system of Australia: A cross-sectional study. *Journal of Dairy Science*, 108(1), 803–820. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-25157>

- Treisman GJ, & Angelino AF. (2008). *Duration of Stool Colonization in Patients Infected with Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase– Producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae.* <https://doi.org/10.1086/533474>
- Tribunal de cuentas Europeo. (2019). Actuación contra la resistencia a los antimicrobianos: pese a los avances en el sector animal, esta amenaza sanitaria sigue siendo un reto para la UE. [https://www.eca.europa.eu/Lists/ECADocuments/SR19\\_21/SR\\_Antimicrobial\\_resistance\\_ES.pdf](https://www.eca.europa.eu/Lists/ECADocuments/SR19_21/SR_Antimicrobial_resistance_ES.pdf)
- Tzouvelekis, L. S., Markogiannakis, A., Psychogiou, M., Tassios, P. T., & Daikos, G. L. (2012). Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(4), 682–707. <https://doi.org/10.1128/CMR.05035-11>
- Umpiérrez, A., Bado, I., Oliver, M., Acquistapace, S., Etcheverría, A., Padola, N. L., ... & Zunino, P. (2017). Zoonotic potential and antibiotic resistance of *Escherichia coli* in neonatal calves in Uruguay. *Microbes and environments*, 32(3), 275-282. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsme2/32/3/32\\_ME17046/pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsme2/32/3/32_ME17046/pdf)
- Ureña, M. C., Benlabidi, S., Raddaoui, A., Lengliz, S., Cheriet, S., Hynds, P., Achour, W., Ghrairi, T., & Abbassi, M. S. (2023). *Occurrence of High-Risk Clonal Lineages ST58, ST69, ST224, and ST410 among Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Escherichia coli Isolated from Healthy Free-Range Chickens (Gallus gallus domesticus) in a Rural Region in Tunisia.* <https://doi.org/10.3390/genes14040875>
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A., & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(18), 5649–5654. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1503141112>
- Van Hoek, A. H. A. M., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A. P., & Aarts, H. J. M. (2011). Acquired Antibiotic Resistance Genes: An Overview. *Frontiers in Microbiology*, 2(SEP), 203. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2011.00203>
- Velkov, T., Roberts, K. D., Nation, R. L., Thompson, P. E., & Li, J. (2013). *Pharmacology of polymyxins: new insights into an “old” class of antibiotics.* <https://doi.org/10.2217/fmb.13.39>
- Vignoli, R., Cordeiro, N. F., García, V., Mota, M. I., Betancor, L., Power, P., Chabalgoity, J. A., Schelotto, F., Gutkind, G., & Ayala, J. A. (2006). New TEM-Derived Extended-Spectrum-Lactamase and Its Genomic Context in Plasmids from *Salmonella enterica* Serovar Derby Isolates from Uruguay. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 50(2), 781–784. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.2.781-784.2006>
- Vignoli, R., García-Fulgueiras, V., Cordeiro, N. F., Bado, I., Seija, V., Aguerrebere, P., Laguna, G., Araújo, L., Bazet, C., Gutkind, G., & Chabalgoity, A. (2016). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, transferable quinolone resistance, and virulotyping in extra-intestinal *E. coli* in Uruguay. *Journal of Infection in Developing Countries*, 10(1), 43–52. <https://doi.org/10.3855/jidc.6918>
- Vila, J., & Marco, F. (2010). Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(10), 726–736. <https://doi.org/10.1016/J.EIMC.2010.05.001>
- Wales, A. D., & Davies, R. H. (2015). Co-Selection of Resistance to Antibiotics, Biocides and Heavy Metals, and Its Relevance to Foodborne Pathogens. *Antibiotics*, 4(4), 567. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS4040567>
- Wang, C., Feng, Y., Liu, L., Wei, L., Kang, M., & Zong, Z. (2020). Identification of novel mobile colistin resistance gene mcr-10. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 508–516. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1732231>
- Wang, M., Guo, Q., Xu, X., Wang, X., Ye, X., Wu, S., Hooper, D. C., & Wang, M. (2009). New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrC, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(5), 1892–1897. <https://doi.org/10.1128/AAC.01400-08>
- Wang, X., Wang, Y., Zhou, Y., Li, J., Yin, W., Wang, S., Zhang, S., Shen, J., Shen, Z., & Wang, Y. (2018). Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, mcr-8, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerging Microbes & Infections*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/S41426-018-0124-Z>
- Werth, B. (2024). *Cefalosporinas - Enfermedades infecciosas - Manual MSD versión para profesionales.* <https://www.msdmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/bacterias-y-f%C3%A1rmacos-antibacterianos/cefalosporinas>

- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., & Holt, K. E. (2017). Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLOS Computational Biology*, *13*(6), e1005595. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1005595>
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L. H., Karch, H., Reeves, P. R., Maiden, M. C. J., Ochman, H., & Achtman, M. (2006). Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Molecular Microbiology*, *60*(5), 1136–1151. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2006.05172.X>
- Wise, R. (1991). Comparative penetration of selected fluoroquinolones into respiratory tract fluids and tissues. *The American Journal of Medicine*, *91*(6), S67–S70. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(91\)90313-M](https://doi.org/10.1016/0002-9343(91)90313-M)
- Xavier, B., Lammens, C., Ruhai, R., Kumar-Singh, S., Butaye, P., Goossens, H., & Malhotra-Kumar, S. (2016). Identification of a novel plasmid-mediated colistin- resistance gene. *Euro Surveill*, *21*(27). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.27.30280>
- Yamamoto, Y., Calvopina, M., Izurieta, R., Villacres, I., Kawahara, R., Sasaki, M., & Yamamoto, M. (2019). Colistin-resistant *Escherichia coli* with *mcr* genes in the livestock of rural small-scale farms in Ecuador. *BMC Research Notes*, *12*(1). <https://doi.org/10.1186/S13104-019-4144-0>
- Yang, Y., Li, B., Ju, F., & Zhang, T. (2013). Materials for Exploring Variation of Antibiotic Resistance Genes in Activated Sludge. *Environmental Science & Technology*, 1–38. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/es4017365>
- Yau, S., Liu, X., Djordjevic, S. P., & Hall, R. M. (2010). RSF1010-like plasmids in Australian *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and origin of their *sul2-strA-strB* antibiotic resistance gene cluster. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, *16*(4), 249–252. <https://doi.org/10.1089/MDR.2010.0033>
- Yin, W., Li, H., Shen, Y., Liu, Z., Wang, S., Shen, Z., Zhang, R., Walsh, T. R., Shen, J., & Wang, Y. (2017). Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *MBio*, *8*(3). <https://doi.org/10.1128/MBIO.00543-17>
- Yu, Z., Qin, W., Lin, J., Fang, S., & Qiu, J. (2015). Antibacterial mechanisms of polymyxin and bacterial resistance. *BioMed Research International*, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/679109>
- Zaman, M. M., & Boles, T. C. (1996). Plasmid recombination by the RecBCD pathway of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *178*(13), 3840–3845. <https://doi.org/10.1128/JB.178.13.3840-3845.1996>
- Zamora Marín, R., Alejandro, D., Regateiro, A., José Gundián, D., Rubén Manresa, D. R., Sánchez, D. J., Rafael, Y., & Sirgado, M. (1998). Cefalosporinas. *ACTA MEDICA*, *8*(1), 40–47. <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2022/06/20293/cefalosporinas.pdf>
- Zhanel, G. G., Golden, A. R., Zelenitsky, S., Wiebe, K., Lawrence, C. K., Adam, H. J., Idowu, T., Domalaon, R., Schweizer, F., Zhanel, M. A., Lagacé-Wiens, P. R. S., Walkty, A. J., Noreddin, A., Lynch, J. P., & Karlowsky, J. A. (2019). Cefiderocol: A Siderophore Cephalosporin with Activity Against Carbapenem-Resistant and Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli. *Drugs*, *79*(3), 271–289. <https://doi.org/10.1007/S40265-019-1055-2>



# ANEXOS



## **ANEXOS**

### **TABLAS DE PRIMERS**

*Tabla 15 Nombre del gen, secuencia de los primers, tamaño del producto de PCR, temperaturas de annealing para cada gen buscado.*

a) Colistina					
Genes buscados de resistencia transferible a colistina					
Gen	Nombre primer	Secuencia	Tamaño del producto	T° annealing	Referencia
<i>mcr-1</i>	<i>mcr1-qr</i>	AAAGACGCGGTACAAGCAAC	213 pb	60 °C Multiplex	(Li et al., 2017)
	<i>mcr1-qr</i>	GCTGAACATACACGGCACAG			
<i>mcr-2</i>	<i>mcr2-qr</i>	CGACCAAGCCGAGTCTAAGG	92 pb		
	<i>mcr2-qr</i>	CAACTGCGACCAACACACTT			
<i>mcr-3</i>	<i>mcr-3 qr</i>	ACCTCCAGCGTGAGATTGTTCCA	169 pb		
	<i>mcr-3 qr</i>	GCGGTTTCACCAACGACCAGAA			
Ciclo de 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, seguido de un aumento de 72 a 95°C para la etapa de curva de fusión.					
<i>mcr-4</i>	<i>mcr-4 F</i>	ATTGGGATAGTCGCCTTTTT	487 pb	52 °C	Carattoli <i>et al.</i> , 2017
	<i>mcr-4 R</i>	TTACAGCCAGAATCATTATCA			
<i>mcr-5</i>	<i>mcr-5 F</i>	TATCTCGACAAGGCCATGCTG	613 pb	60 °C	Borowiak <i>et al.</i> , 2017
	<i>mcr-5 R</i>	GAATCTGGCGTTTCGTCTAGT			
<i>mcr-6</i>	<i>mcr-6-For</i>	AAGTATCTTGGTGGCGTGGG	844pb	58 °C	Primer BLAST
	<i>mcr-6-Rev</i>	ATTACCTTCGCACACAGGGG			
<i>mcr-7</i>	<i>mcr7.1_fw</i>	AGGGGATAAACCGACCCTGA	335pb	55 °C	Yang <i>et al.</i> , 2018
	<i>mcr7.1_rev</i>	TGATCTCGATGTTGGGCACC			
<i>mcr-8</i>	<i>mcr8 F</i>	ACAGACAATAAGCGGGGAGC	712pb	56 °C	Primer BLAST
	<i>mcr8 R</i>	CAATAAGCGCATCACCTGC			
<i>mcr-9</i>	<i>mcr9F</i>	TTTGATTGCAGGTGTTGCCG	900 pb	57 °C	Primer BLAST
	<i>mcr9R</i>	AGATATAGCCCGCTTTCGCC			
Programa: 1) 94°C - 5:00 min. 2) 94°C - 0:40 min / T de alineación - 0:40 min / 72°C - 0:40 min, 35 ciclos. 3) 72°C - 10:00 min					
b) oximinocefalosporinas					
Genes buscados de cefalosporinasas (AmpC)					
Gen	Nombre primer	Secuencia	Tamaño del producto	T° annealing	Referencia
<i>bla<sub>CIT</sub> (CMY)</i>	<i>CIT F</i>	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	461 pb	64°C Multiplex	García Fulgueiras <i>et al.</i> , 2019
	<i>CIT R</i>	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC			
	<i>DHA F</i>	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT	404 pb		

<i>bla</i> <sub>DHA</sub>	DHA R	CCGTACGCATACTGGCTTTGTC			Cordeiro <i>et al.</i> , 2016  Perez-Perez & Hanson, 2002
<i>bla</i> <sub>MOX</sub>	MOX F	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	519 pb		
	MOX R	CACATTGACATAGGTGTGGTGC			
<i>bla</i> <sub>ACC</sub>	ACC F	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	345 pb		
	ACC R	TTCGCCGCAATCATCCCTAGC			
<i>bla</i> <sub>EBC</sub>	EBC F	TCGGTAAAGCCGATGTTGCCG	309 pb		
	EBC R	CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT			
<i>bla</i> <sub>FOX</sub>	FOX F	AACATGGGGTATCAGGGAGAT	189 pb		
	FOX R	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG			
Programa: 1) 94°C - 3:30 min. 2) 94°C - 0:30 min / T de alineación - 0:30 min / 72°C - 1:00 min, 25 ciclos. 3) 72°C - 7:00 min					
<b>Genes buscados de betalactamasas de espectro extendido (BLEE)</b>					
Gen	Nombre primer	Secuencia	Tamaño del producto	T° annealing	Referencia
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	SHV A	ATGATGAGCACCTTTAAAGTA	620 pb	52°C	García Fulgueiras <i>et al.</i> , 2019
	SHV B	ATTTGCTCGGCCATGCTCGC			
<i>bla</i> <sub>PER-2</sub>	PER 2 F	TGTGTTTTACCGCTTCTGCTCTG	878 pb	48°C	Vignoli R <i>et al.</i> , 2005
	PER 2 R	CAGCTCAAAGTATAAGCCGCTTG			
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	OT3	ATGAGTATTCAAACTTTCCG	900 pb	52°C	Vignoli R <i>et al.</i> , 2006
	OT4	CCACTGCTTAATCAGTGAGG			
<i>bla</i> <sub>PAN-CTX-M</sub>	PANCTX M F	TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA	543 pb	59°C	Moyá <i>et al.</i> , 2012
	PAN CTX M R	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA			
<i>bla</i> <sub>CTX-M gr1</sub>	CTX-M-1 F	CCCATGGTTAAAAAATCACTG	830 pb (F-AS)	54°C	García-Fulgueiras <i>et al.</i> , 2017
	CTX-M-1 R	GCTAGCCGGGCCGCAACGTGA			
	CTX-M- AS R	CGTAGCCGGGCCGCAACGTGA	450 pb (F-R)		
<i>bla</i> <sub>CTX-M gr2</sub>	CTX-M gr2 F	TTAATGATGACTCAGAGCATT	875 pb	51°C	García Fulguei <i>et al.</i> , 2019
	CTX-M gr2 R	GATACCTCGCTCCATTTATTGC			
<i>bla</i> <sub>CTX-M gr3</sub>	CTX-M gr3 F	ACCTGATTAAC TACAATCCCAT	514 pb	55°C	
	CTX-M gr3 R	ACTTTCTGCCTTCTGCTCTGGC			
<i>bla</i> <sub>CTX-M gr4</sub>	CTX-M gr4 F	GCTGGAGAAAAGCAGCGGAG	473 pb	57°C	
	CTX-M gr4 R	GTAAGCTGACGCAACGTCTG			

<i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub> (gr3)	CTX-M-8 F	TGAATACTTCAGCCACACG	922 pb	50°C	
	CTX-M-8 R	TAGAATTAATAACCGTCGGT			
<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> (gr4)	CTX-9-M F	ATGGTGACAAAGAGARTGCAA	841 pb	60°C	
	CTX-9-M R	TTACAGCCCTTCGGCGATGAT			
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> gr25	CTX-M-25 F	AGAAAAAGCGTAAGGCGGGC	862 pb	56°C	Yossapol <i>et al.</i> , 2017
	CTX-M-25 R	CCGTCGGTGACAATTCTGGC			
<p><b>Grupos de CTX-M:</b> - Grupo 1: 1, 3, 10, 12, 15. - Grupo 2: 2, 4, 5, 6, 7, 20. - Grupo 3: 8. - Grupo 4: 9, 13, 14, 16, 17, 19, 21, 27. - Grupo 25: 25, 26</p> <p><b>Programa:</b> 1) 94°C - 5:00 min. 2) 94°C - 1:00 min / T de alineación - 1:00 min / 72°C - 1:00 min, 30 ciclos. 3) 72°C - 5:00 min</p>					
<b>c) Quinolonas</b>					
<b>Genes buscados de resistencia transferible a fluoroquinolonas</b>					
Gen	Nombre primer	Secuencia	Tamaño del producto	T° annealing	Referencia
<i>qnrA</i>	qnrA f	ATTTCTCACGCCAGGATTTG	516 pb	53 °C	Chen <i>et al.</i> , 2012
	qnrA r	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA			
<i>qnrB</i>	qnrB f	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	469 pb	52 °C	García Fulgueiras, <i>et al</i> 2017
	qnrB r	ACGACGCCTGGTAGTTGTCC			
<i>qnrC</i>	qnrC f	GGGTTGTACATTTATTGAATC	307 pb	50 °C	
	qnrC r	CACCTACCCATTTATTTTCA			
<i>qnrD</i>	qnrD f	CGAGATCAATTTACGGGAATA	580 pb	51 °C	
	qnrD r	AACAAGCTGAAGCGCCTG			
<i>qnrS</i>	qnrS f	ACGACATTCGTCAACCTGCAA	417 pb	53 °C	
	qnrS r	TAAATTGGCACCCCTGTAGGC			
<i>qnrE</i>	qnrE1-F	GGCATTGATTTTTGAAGGCGA	516 pb	55 °C	
	qnrE1-R	GTGGGTAAAATTGGCCGCTC			
<i>qnrVC</i>	qnrVC f	ATGGAAAAATCAAAGCAATT	656 pb	46°C	
	qnrVC r	TTAGTCAGGAACAATGATTA			
<p><b>Programa:</b> 1) 94°C - 5:00 min. 2) 94°C - 1:00 min / T de alineación - 1:00 min / 72°C - 1:00 min, 30 ciclos. 3) 72°C - 7:00 min</p>					
<b>d) aminoglucósidos</b>					
<b>Genes buscados de resistencia transferible aminoglucósidos</b>					
Gen	Nombre primer	Secuencia	Tamaño del producto	T° annealing	Referencia
<i>aac</i>	aac f	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	481 pb	55	García-Fulgueiras <i>et al.</i> , 2019
	aac r	CTCGAATGCCTGGCGTGT			
	armA f	TATGGGGTCTTACTATTCTGCCTAT	514 pb	54	

<i>armA</i>	armA r	TGTTGGATTCCCTTCTCCTTT			
<i>rmtA</i>	rmtA f	CTAGCGTCCATCCTTTCTCTC	634 pb	58	
	rmtA r	TTTGCTTCCATGCCCTTGCC			
<i>rmtB</i>	rmtB f	TCAACGATGCCCTCACCTC	458 pb	56	
	rmtB r	GCAGGGCAAAGGTAATAATCC			
<i>rmtC</i>	rmtC f	GCCAAAGTACTACAAGTGG	751 pb	56	
	rmtC r	CTCAGATCTGACCCAACAAG			
<i>rmtD</i>	rmtD f	CAGTTGAAGCCAGCGGAACGC	371 pb	66	
	rmtD r	GCGCCTCCATCCATTCGGAATAG			
<i>npmA</i>	npmA f	CTCAAACCAAGAAAGACGG	640 pb	52	
	npmA r	GAAACATGGCCAGAAACTC			
<i>rmtC (Ab)</i>	rmtC F	CGAAGAAGTAACAGCCAAA	710 pb	38	
	rmtC R	ATCCCAACATCTCTCCCACT			
<i>rmtE</i>	rmtE F	ATGAATATTGATGAAATGGTT		50	
	rmtE R	TGATTGATTTCCTCCGTTTTT			
<i>rmtF</i>	rmtF F	ACGCATCTGCACCAGATCACC	678pb	60	
	rmtF R	GGGCAGGAGCTTCATCAGAA			
<i>rmtG</i>	rmtG F	AAATACCGGATGTGTGTCC	249pb	58	
	rmtG R	ACACGGCATCTGTTTCTTCC			
<i>rmtH</i>	rmtH F	AGGTGGAAGAGCAGGCAAG	493 pb	56	
	rmtH R	CTCAAACCAGGTGGCGTAGT			

**Programa: 1) 98°C - 3:00 min. 2) 98°C - 10 s / T de alineación - 30 s / 72°C - 1:00 min, 30 ciclos. 3) 72°C - 5:00 min**

#### **e) Fosfomicina**

##### **Genes buscados de resistencia transferible fosfomicina**

Gen	Nombre primer	Secuencia	Tamaño del producto	T° annealing	Referencia
<i>fosA</i>	fosA F	ATCTGTGGGTCTGCCTGTCGT	271pb	56	<b>Garcia-Fulgueiras et al., 2019</b>
	fosA R	ATGCCCGCATAGGGCTTCT			
<i>fosB</i>	fosB F	AATCGGATTTTAGTGTGAAACA		58	<b>Xu et al., 2013</b>
	fosB R	GGGTAATCGGATAATAGTGTGGA			
<i>fomA</i>	fomA F	GGGGATCCACGCCGATTTCTTGGCC	795pb	60	<b>Kobayashi et al., 2000</b>
	fomA R	GGGGATCCCGCAGAAGCAGTCGTGGTG			
<i>fomB</i>	fomB F	GGGGATCCCTGGAAAACCTCAGATCCGC	991pb	60	
	fomB R	GGGGATCCTTCGGCAAGCTGCTTGAGCGTC			

<i>fosA3</i>	fosA3 F	TGA ATC ATC TGA CGC TGG	404pb	45	<b>Garcia-Fulgueiras et al., 2019</b>
	fosA3 R	TCA ATC AAA AAA GAC CATC			
<i>fosC2</i>	fosC2 F	CGT TCC GTG GAG TTC TAT AC	<b>334pb</b>	<b>54</b>	<b>Nakamura et al., 2014</b>
	fosC2 R	CTT GAT AGG GTT TAG ACT TC			
<i>fosA7</i>	fosA7F	ATGCTTCAATCTCTGAACCAC	<b>409pb</b>	<b>52</b>	
	fosA7R	CCGAAACGCATTCCAGAGTA			
<b>Programa: 1) 98°C - 3:00 min. 2) 98°C - 10 s / T de alineación - 30 s / 72°C - 1:00 min, 30 ciclos. 3) 72°C - 5:00 min</b>					

Tabla 16 Nombre del gen, secuencia de los primers, tamaño del producto de PCR, temperaturas de annealing para cada grupo de incompatibilidad plasmídico

Grupos de incompatibilidad plasmídico					
Gen	Nombre primer	Secuencia	Tamaño del producto	T° annealing	Referencia
HI1	HI1-F	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	471	58 °C Multiplex	Carattoli et al., 2005
	HI1-R	TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA			
HI2	HI2-F	TTTCTCCTGAGTCACCTGTAAACAC	644		
	HI2-R	GGCTCACTACCGTTGTATCCT			
I1	I1-F	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	139		
	I1-R	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT			
X	X-F	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT	376		
	X-R	TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC			
L/M	L/M-F	GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG	785		
	L/M-R	CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG			
N	N-F	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	559		
	N-R	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC			
FIA	FIA-F	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	462		
	FIA-R	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG			
FIB	FIB-F	GGAGTTCTGACACAGATTTTCTG	702		
	FIB-R	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT			
W	W-F	CCTAAGAACAACAAGCCCCCG	242		
	W-R	GGTGCGGGCATAGAACCGT			
Y	Y-F	AATTCAAAACAACACTGTGCAGCCTG	765		
	Y-R	GCGAGAATGGACGATTACAAAACTTT			
P	P-F	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA	534		
	P-R	TCACGCGCCAGGGCGCAGCC			
FIC	FIC-F	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG	262		
	FIC-R	TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT			
A/C	A/C-F	GAGAACCAAAGACAAGACCTGGA	465		
	A/C-R	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT			
T	T-F	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT	750		
	T-R	CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC			
	FIIS-F	CTGTCGTAAGCTGATGGC	270		

FIIS	FIIS-R	CTCTGCCACAACTTCAGC			
F rep B	F-F	TGATCGTTTAAGGAATTTTG	270	52 °C	
	F-R	GAAGATCAGTCACACCATCC			
K/B K	K/B-F	GCGGTCCGAAAGCCAGAAAAC	160	52 °C	
	K-R	TCTTTCACGAGCCCGCCAAA			
K/B B/O	K/B-F	GCGGTCCGAAAGCCAGAAAAC	160	52 °C	
	B/O-R	TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA			
FII K	FII K-F	TCTTCTCAATCTTGGCGGA	150	60 °C	Villa et al., 2010
	FII K-R	GCTTATGTTGCACRGAAGGA			
FI	FII-F	CTGATCGTTTAAGGAATTTT	260	54 °C	
	FII-R	CACACCATCTGCACTTA			
<b>Programa: 1) 94°C - 5:00 min. 2) 94°C - 1:00 min / T de alineación - 1:00 min / 72°C - 1:00 min, 30 ciclos. 3) 72°C - 5:00 min</b>					
Incl2	I2-repR-F	TTACAGTGCAAGCTAAGTGCAG	615	55 °C	Chen et al., 2013
	I2-repA-R	GATTCACGGTCCCATATCGT			
<b>Programa: 1) 95°C - 4:00 min. 2) 95°C – 30s / T de alineación – 30s / 72°C – 45s, 45 ciclos. 3) 72°C - 7:00 min</b>					
IncX1	IncX1-F	GCTTAGACTTTGTTTTATCGTT	461	52 °C	Johnson et al., 2012
	IncX1-R	TAATGATCCTCAGCATGTGAT			
IncX2	IncX2-F	GCGAAGAAATCAAAGAAGCTA	678	52 °C	
	IncX2-R	TGTTGAATGCCGTTCTTGTCAG			
IncX3	IncX3-F	GTTTTCTCCACGCCCTTGTTCA	351	52 °C	
	IncX3-R	CTTTGTGCTTGGCTATCATAA			
IncX4	IncX4-F	AGCAAACAGGAAAGGAGAAGACT	569	52 °C	
	IncX4-R	TACCCCAAATCGTAACCTG			
<b>Programa: 1) 94°C - 5:00 min. 2) 94°C - 1:00 min / T de alineación - 1:00 min / 72°C - 1:00 min, 30 ciclos. 3) 72°C - 5:00 min</b>					

Tabla 17 Nombre del gen, secuencia de los primers, tamaño del producto de PCR, temperaturas de annealing para cada gen para MLST de *E. coli*.

Genes MLST <i>E. coli</i>					
Gen	Nombre primer	Secuencia	Tamaño del producto	T° annealing	Referencia
<i>adk</i>	adk F	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG	545pb	54	Ahmed etal., 2016
	adk R	CCGTCAACTTTCGCGTATTT			
<i>fumC</i>	fumC R	GTACGCAGCGAAAAAGATTC	786pb	54	
	fumC F	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC			
<i>gyrB</i>	gyrB F	TCGGCGACACGGATGACGGC	879pb	60	
	gyrB R	ATCAGGCCTTCACGCGCATC			
<i>icd</i>	icd F	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA	849pb	54	
	icd R	GGACGCAGCAGGATCTGTT			
<i>mdh</i>	mdh F	AGCGGTTCTGTTCAAATGC	779pb	60	
	mdh R	CAGGTCAGAACTCTCTCTGT			
<i>pur A</i>	pur A F	CGCGCTGATGAAAGAGATGA	816pb	54	
	pur A R	CATACGGTAAGCCACGCAGA			
<i>rec A</i>	rec A F	CGCATTGCTTTACCCTGACC	780pb	58	
<b>Programa: 1) 95°C - 2:00 min. 2) 95°C – 1:00 min / T de alineación – 1:00 min / 72°C - 1:00 min, 30 ciclos. 3) 72°C - 5:00 min</b>					



# Transferable Resistance to Highest Priority Critically Important Antibiotics for Human Health in *Escherichia coli* Strains Obtained From Livestock Feces in Uruguay

## OPEN ACCESS

**Edited by:**  
Isarene Magouras,  
City University of Hong Kong,  
Hong Kong

**Reviewed by:**  
Lucy Bluntton,  
Royal Veterinary College (RVC),  
United Kingdom  
Patrick Meester,  
University of Veterinary Medicine  
Vienna, Austria

**\*Correspondence:**  
Rafael Vignat  
vignat@higumvetsk.uv  
Inés Bado  
ibado@higumvetsk.uv

**Specialty section:**  
This article was submitted to  
Veterinary Epidemiology and  
Economics,  
a section of the journal  
Frontiers in Veterinary Science

**Received:** 29 July 2020  
**Accepted:** 19 October 2020  
**Published:** 19 November 2020

**Citation:**  
Coppola N, Fraire B, Umpiérrez A,  
Cordero NF, Avila P, Tronchi G,  
Castro G, Casaux M, Fraga M,  
Zunino P, Bado I and Vignat R (2020)  
Transferable Resistance to Highest  
Priority Critically Important Antibiotics  
for Human Health in *Escherichia coli*  
Strains Obtained From Livestock  
Feces in Uruguay.  
Front. Vet. Sci. 7:588919.  
doi: 10.3389/fvets.2020.588919

Nadia Coppola<sup>1</sup>, Bibiana Fraire<sup>2</sup>, Ana Umpiérrez<sup>3</sup>, Nicolás F. Cordero<sup>1</sup>, Pablo Avila<sup>1</sup>, Gustavo Tronchi<sup>4</sup>, Gustavo Castro<sup>2</sup>, María Laura Casaux<sup>5</sup>, Martín Fraga<sup>5</sup>, Pablo Zunino<sup>2</sup>, Inés Bado<sup>6\*</sup> and Rafael Vignat<sup>6\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bacteriología y Virología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; <sup>2</sup> Unidad Académica Animal de Ganja, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; <sup>3</sup> Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay; <sup>4</sup> Veterinario de Línea Ejercicio, Montevideo, Uruguay; <sup>5</sup> Plataforma de Investigación en Salud Animal, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Colonia, Uruguay

The aim of this work was to detect *Escherichia coli* isolates displaying resistance to oxyimino-cephalosporins, quinolones, and colistin in feces from livestock in Uruguay. During 2016–2019, fecal samples from 132 broiler and layer chicken flocks, 100 calves, and 50 pigs, were studied in Uruguay. Samples were cultured on MacConkey Agar plates supplemented with ciprofloxacin, ceftaxone, or colistin. *E. coli* isolates were identified by mass spectrometry and antibiotic susceptibility testing was performed by disk diffusion agar method and colistin agar test. Antibiotic resistance genes were detected by polymerase chain reaction and sequencing. The most frequently detected resistance gene was *qnrS19*, recovered from 87 animals. Regarding plasmid-mediated quinolone resistance genes, *qnrS1* was the second in prevalence (23 animals) followed by *qnrE1*, found in 6 chickens and two calves. Regarding resistance to oxyimino-cephalosporins, 8 different  $\beta$ -lactamase genes were detected: *bla*<sub>CTX-M-8</sub> and *bla*<sub>CMY-2</sub> were found in 23 and 19 animals, respectively; next, *bla*<sub>CTX-M-2</sub> and *bla*<sub>SHV-12</sub> in 7 animals each, followed by *bla*<sub>CTX-M-14</sub> in 5, *bla*<sub>CTX-M-15</sub> and *bla*<sub>SHV2a</sub> in 2, and *bla*<sub>CTX-M-55</sub> in a single animal. Finally, the *mcr-1* gene was detected only in 8 pigs from a single farm, and in a chicken. Isolates carrying *bla*<sub>CMY-2</sub> and *bla*<sub>SHV-12</sub> were also found in these animals, including two isolates featuring the *bla*<sub>CMY-2</sub>/*mcr-1* genotype. To the best of our knowledge, this is the first work in which the search for transferable resistance to highest priority critically important antibiotics for human health is carried out in chickens and pigs chains of production animals in Uruguay.

**Keywords:** swine, poultry, ESBL, *E. coli*, MCR-1, CTX-M-8, CMY-2, *qnrS19*

## Imported One-Day-Old Chicks as Trojan Horses for Multidrug-Resistant Priority Pathogens Harboring *mcr-9*, *rmtG*, and Extended-Spectrum $\beta$ -Lactamase Genes

Nadia Coppola,<sup>a</sup> Nicolás F. Cordeiro,<sup>a</sup> Gustavo Trenchi,<sup>b</sup> Fernanda Espósito,<sup>c</sup> Bruna Fuga,<sup>d</sup> Danry Fuentes-Castillo,<sup>e</sup> Nilton Lihcopan,<sup>f,g</sup> Andrés Iriarte,<sup>f</sup> Inés Bado,<sup>h</sup> Rafael Vignoli<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Bacteriología y Virología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>b</sup>Veterinario de Libre Ejercicio, Montevideo, Uruguay

<sup>c</sup>Faculdade de Ciências Farmacéuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>d</sup>Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>e</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>f</sup>Departamento de Diagnóstico Bacteriológico, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

Nadia Coppola and Nicolás F. Cordeiro contributed equally to this work; author order was determined alphabetically. Rafael Vignoli and Inés Bado share senior authorship.

**ABSTRACT** Antimicrobial resistance is a critical issue that is no longer restricted to hospital settings but also represents a growing problem involving intensive animal production systems. In this study, we performed a microbiological and molecular investigation of priority pathogens carrying transferable resistance genes to critical antimicrobials in 1-day-old chickens imported from Brazil to Uruguay. Bacterial identification was performed by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry, and antibiotic susceptibility was determined by SensiSite. Antimicrobial resistance genes were sought by PCR, and clonality was assessed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Four multidrug-resistant (MDR) representative strains were sequenced by an Illumina and/or Oxford Nanopore Technologies device. Twenty-eight MDR isolates were identified as *Escherichia coli* ( $n = 14$ ), *Enterobacter cloacae* ( $n = 11$ ), or *Klebsiella pneumoniae* ( $n = 3$ ). While resistance to oxyiminocephalosporins was due to *bla*<sub>TEM-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, and *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, and *bla*<sub>CTX-M-15</sub> plasmid-mediated quinolone resistance was associated with the *qnrB1*, *qnrE1*, and *qnrB2* genes. Finally, resistance to aminoglycosides and fosfomycin was due to the presence of 16S rRNA methyltransferase *rmtG* and *fosA*-type genes, respectively. Short- and long-read genome sequencing of *E. cloacae* strain ODC\_Edo3 revealed the presence of *IncQ/rmtG* (pUR-EC3.1; 7,400 bp), *IncH2A/mcr-9.1/bla*<sub>CTX-M-15</sub> (pUR-EC3.2; ST16 [pMLST; 408,436 bp]), and *IncN2/qnrB19/aacC3/aph(3)-Ib* (pUR-EC3.3) resistance plasmids. Strikingly, the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene was carried by a novel Tn796-like composite transposon designated Tn7337. In summary, we report that imported 1-day-old chicks can act as Trojan horses for the hidden spread of WHO critical-priority MDR pathogens harboring *mcr-9*, *rmtG*, and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase genes in poultry farms, which is a critical issue from a One Health perspective.

**IMPORTANCE** Antimicrobial resistance is considered a significant problem for global health, including within the concept of One Health, therefore, the food chain connects human health and animal health directly. In this work, we searched for microorganisms resistant to antibiotics considered critical for human health in intestinal microbiota of 1-day-old baby chicks imported to Uruguay from Brazil. We describe genes for resistance to antibiotics whose use the WHO has indicated to “watch” or “reserve” (AWaRe classification), such as *rmtG* and *mcr-9*, which confer resistance to all the aminoglycosides and colistin, respectively, among other genes, and their presence in new mobile genetic

Editor: Martha Vivek, Universidad de los Andes

Copyright © 2022 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Inés Bado, [ibado@higien.edu.uy](mailto:ibado@higien.edu.uy), or Rafael Vignoli, [rvignoli@higien.edu.uy](mailto:rvignoli@higien.edu.uy)

Received 25 August 2021

Accepted 20 October 2021

Accepted manuscript posted online 3 November 2021

Published 25 January 2022

Link de acceso:

[https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.01675-21?url\\_ver=Z39.88-2003&rft\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rft\\_dat=cr\\_pub++0pubmed](https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.01675-21?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rft_dat=cr_pub++0pubmed)

## POSTERS PRESENTADOS EN CONGRESOS

Coppola N, Cordeiro N, Trenchi G, Bado I, Vignoli R. “**Seguimiento de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en diferentes etapas de la vida productiva del ave**”. VII Congreso AUPA 2021. Poster.

Coppola N, Cordeiro N, Freire B, Castro G, Zunino P, Bado I, Vignoli R. “**Caracterización molecular de aislamientos de *Escherichia coli* productores de *mcr-1* obtenidos de materia fecal de cerdos en producción de Uruguay**”. I XXV Congreso Latinoamericano de Microbiología – ALAM 2021. Seleccionado para su presentación oral por Nadia Coppola.

Coppola N, Cordeiro N, Trenchi G, Zunino P, Bado I, Vignoli R. “**Detección de enzimas 16SARN metiltransferasas en enterobacteriales resistentes a ceftriaxona aislados de pollitos de un día**”. “I Congreso Virtual de Microbiología Veterinaria. Universidad de La Plata. 2021. Poster.

Cordeiro N, Coppola N, Trenchi G, Iriarte A, Esposito F, Fuga B, Fuentes Castillo D, Lincopan N, Bado I, Vignoli R. “**Plasmidome analysis of an *E. cloacae* isolate carrying *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *mcr9.1*, *rmtG* and *qnrB19* obtained from one-day-old chicks in Uruguay**”. World Microbe Forum. 2021. Poster.

Bado I, Coppola N, Trenchi G, Esposito F, Fuga B, Fuentes-Castillo D, Lincopan N, Cordeiro N, Vignoli R. “**Genomic characterization of highly virulent, CTX-M-55-FosA3 -producing *Escherichia coli* ST224 isolated from feces of one-day-old-chicken imported from Brazil**”. World Microbe Forum. 2021. Poster.

Coppola N, Cordeiro N, Trenchi G, Ávila P, Zunino P, Bado I, Vignoli R. “**Chicken Run**”. ASM Microbe. Chicago, Estados Unidos. 2020. Poster.

Coppola N, Ávila P, Trenchi G, Freire B, Umpiérrez A, Cordeiro N, Castro G, Casaux, MI, Fraga M, Zunino P, Bado I, Vignoli R. “**Rebellion on the farm**”. ASM Microbe. Chicago, Estados Unidos. 2020. Poster.

Coppola N, Freire B, Umpiérrez A, Cordeiro N, Ávila P, Trenchi G, Castro G, Casaux, MI, Fraga M, Zunino P, Bado I, Vignoli R. “**Detección de genes *mcr* en enterobacterias resistentes a colistina aisladas de animales de producción de Uruguay, y pollitos BB importados de Brasil**”. IV Encuentro Nacional de Jóvenes Microbiólogos. Montevideo, Uruguay. 2020. Seleccionado para su presentación oral por Nadia Coppola.

Coppola N, Cordeiro N, Trenchi G, Ávila P, Zunino P, Bado I, Vignoli R. “**Genes transferibles de resistencia a antibióticos críticos en *E. coli* aisladas de hisopados cloacales de aves de producción en Uruguay**”. XI Jornadas Técnicas Veterinarias 1 y 2 de octubre 2019, Facultad de Veterinaria, Udelar. Poster.

Coppola N, Umpiérrez A, Cordeiro N, Fabiano S, Casaux ML, Caffarena RD, Schild C, Giannitti F, Fraga M, Zunino P, Bado I, Vignoli R. “**Detección de *Escherichia coli* diarreogénicas y extraintestinales y de genes de resistencia a antibióticos en aislamientos de terneros de leche de Uruguay**”. II Congreso Nacional de Biociencias. Montevideo, Uruguay. 2019. Poster.

Coppola N, Cordeiro N, Trenchi G, Ávila P, Zunino P, Bado I, Vignoli R. “**Genes de resistencia antibiótica transferibles en enterobacterias recuperadas de pollitos de un día importados de Brasil**”. II Congreso Nacional de Biociencias. Montevideo, Uruguay. 2019. Seleccionado para su presentación oral por Nadia Coppola.

## PROYECTOS FINANCIADOS EN CONTEXTO DE LA INVESTIGACIÓN

2020-2021. “Resistencia a cefalosporinas de tercera generación, quinolonas y colistina en *Escherichia coli* aisladas de muestras de cerdos en producción de Uruguay”, Proyecto de iniciación a la investigación, llamado 2019 (CSIC). **Responsable: Nadia Coppola**

2018-2020. “Resistencia transferible a polimixinas: estado de emergencia”. Financiación Fondo María Viñas (ANII). Responsable: Rafael Vignoli y Teresa Camou. **Rol: Investigadora.**

## BECA

2018-2022. Beca de maestría financiada en el marco del Proyecto de investigación Aplicada Fondo María Viñas, llamado 2017 (proyecto FMV\_1\_2017\_1\_135826). Título: “Resistencia transferible a polimixinas: estado d emergencia”. Por 24 meses, finalizada.