



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“PREVALENCIA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS A TRAVÉS DE
LA SUSCEPTIBILIDAD DE *Escherichia coli* EN AVES DE COMBATE EN
EL NORTE DEL ESTADO DE MÉXICO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

SANDRA VILLAGRAN RAMÍREZ

ASESORES:

DR. MARTÍN TALAVERA ROJAS
DR. EDGARDO SORIANO VARGAS
MVZ AGUSTÍN H. PEÑA ROMERO

REVISORES:

DRA. ADRIANA DEL C. GUTIÉRREZ CASTILLO
DR. VALENTE VÁZQUEZ ORDOÑEZ



TOLUCA, MÉXICO; NOVIEMBRE DE 2017

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México.

Al Dr. Martín Talavera Rojas, por la oportunidad de realizar este trabajo, por su guía, conocimiento, paciencia y orientación que siempre me brindó.

Al Dr. Edgardo Soriano Vargas y al MVZ Agustín H. Peña Romero en la colaboración y el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Adriana del C. Gutiérrez Castillo y al Dr. Valente Vázquez Ordoñez, por sus observaciones y recomendaciones que me permitieron terminar el presente trabajo.

A la T.Q.L. Silvia Martínez Tarango, a la M. en C. Raquel Fuentes Arriaga, al M. en C. Saúl Aguilar, a Yair Jesús Cortez Nuñez† y a mi equipo de trabajo por su conocimiento, capacitación, apoyo y buena voluntad.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, el cual permitió la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

“A Dios, Quien es el dueño de mi vida dándome la fortaleza para superar las
dificultades y cumplir todas mis metas”.

A mi madre, hermana y hermanos, porque sin ellos no hubiera sido posible
culminar este sueño, por todos sus consejos y su amor incondicional”.

“A mis amigos y compañeros, por brindarme su ayuda, conocimiento y por
compartir este bello momento de formación”.

“A la Universidad Autónoma del Estado de México, por haberme brindado la
oportunidad de formarme íntegramente”.

RESUMEN

PREVALENCIA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS A TRAVÉS DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE *Escherichia coli* EN AVES DE COMBATE EN EL NORTE DEL ESTADO DE MÉXICO

Villagran Ramírez Sandra, Talavera Rojas Martín, Soriano Vargas Edgardo, Peña Romero Agustín Horacio.

El presente trabajo se llevó a cabo con la finalidad de conocer el patrón de resistencia de cepas de *Escherichia coli* a diversos antibióticos. Se emplearon 197 cepas recolectadas en galleras que se encuentran afiliadas a la Federación Mexicana de Criadores de Gallos de Pelea en los Municipios de Atlacomulco y El Oro, Estado de México. Todos los aislamientos se identificaron por medio de pruebas bioquímicas de rutina. La sensibilidad *in vitro* se realizó mediante la prueba de difusión en agar en la que se emplearon 12 antimicrobianos; la mayoría de los aislamientos fueron resistentes a la carbenicilina (55.8%), ampicilina (55.3%), en orden descendente le sigue el trimetoprim-sulfametoxazol (52.2%) y cefalotina (42.1%). Los antibióticos con menor porcentaje de resistencia fueron netilmicina (14.7%) y ceftriaxona (0.5%). El municipio que presentó el mayor número de aislamientos resistentes fue Atlacomulco. En México la proporción de cepas resistentes son más elevadas que en otros países, lo cual puede estar relacionado con el uso no controlado e indiscriminado de estos fármacos tanto en salud animal como en salud humana.

Palabras clave: Resistencia, *Escherichia coli*, antibióticos.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	ii
DEDICATORIA	iii
RESUMEN	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA	2
Importancia del gallo de combate	2
<i>Escherichia coli</i>	4
Colibacilosis aviar	12
Antimicrobianos	14
Resistencia Bacteriana	19
Mecanismos de Resistencia de las Bacterias	21
Antibiograma por difusión en agar	23
III. JUSTIFICACIÓN	27
IV. HIPÓTESIS	29
V. OBJETIVO	30
VI. MATERIAL	31
VII. METODOLOGÍA	34
VIII. LÍMITE DE ESPACIO	41
IX. LÍMITE DE TIEMPO	42
X. RESULTADOS	43
XI. DISCUSIÓN	52
XII. CONCLUSIONES	57
XIII. SUGERENCIAS	58
XIV. LITERATURA CITADA	59

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Clasificación Taxonómica de <i>Escherichia coli</i>	5
Cuadro 2. Serotipos y serogrupos más comunes de <i>Escherichia coli</i> causante de diarrea	7
Cuadro 3. Población total de aves de galleras que se encuentran afiliadas a la Federación Mexicana de Criadores de Gallos de Pelea en los Municipios de Atlacomulco y El Oro	35
Cuadro 4. Número de aves a muestrear en el municipio de Atlacomulco. Estrato A	35
Cuadro 5. Número de aves a muestrear en el municipio de El Oro. Estrato B	36
Cuadro 6. Pruebas Bioquímicas realizadas a las muestras	37
Cuadro 7. Interpretación del diámetro del diámetro en mm de la prueba de difusión en disco	39
Cuadro 8. Cronograma de Actividades	42
Cuadro 9. Patrón de sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>Escherichia coli</i> de aves de combate (n=197) mediante la prueba de difusión en agar en los municipios de Atlacomulco y El Oro	43
Cuadro 10. Patrón de sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>Escherichia coli</i> de aves de combate (n=130) mediante la prueba de difusión en agar en el municipio de Atlacomulco	45

Cuadro 11. Patrón de susceptibilidad <i>in vitro</i> de <i>Escherichia coli</i> de aves de combate (n=67) mediante la prueba de difusión en agar en el municipio de El Oro	45
Cuadro 12. Comparación de la frecuencia de la resistencia de las cepas de <i>Escherichia coli</i> de aves de combate mediante la prueba de difusión en agar en los municipios de Atlacomulco (n=130) y El Oro (n=67)	46
Cuadro 13. Porcentaje de aislamientos resistentes por socio en el municipio de Atlacomulco	48
Cuadro 14. Porcentaje de aislamientos resistentes por socio en el municipio de El Oro	48
Cuadro 15. Subgrupo de β -lactámicos que fueron empleados	50
Cuadro 16. Patrones de multirresistencia antimicrobiana de <i>E. coli</i>	51

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mecanismos de Acción de los Distintos Antimicrobianos	19
Figura 2. Frecuencia de la resistencia de las cepas aisladas de <i>Escherichia coli</i> de aves de combate (n=197) mediante la prueba de difusión en agar en los municipios de Atlacomulco y El Oro	44

I. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años ha sido significativo el aumento de la resistencia de las diferentes bacterias que causan diferentes infecciones clínicas importantes en las aves (Pineda *et al.*, 2015).

La resistencia a antimicrobianos se ha reportado casi en todos los países y demuestra que los microorganismos han desarrollado, en su proceso evolutivo, formas más eficaces para evadir los puntos de acción del antimicrobiano, este fenómeno se observa en mayor grado en *Escherichia coli* debido a la capacidad que esta bacteria tiene para captar mecanismos de resistencia y transmitirlos a otras bacterias e incluso a otros géneros bacterianos (Cabrera S., 2009).

La resistencia antimicrobiana aumenta el riesgo de terapias inadecuadas, lo cual puede prolongar la infección y facilita la transmisión de la enfermedad. Esto no solo afecta a las aves enfermas, sino también a las aves sanas que se encuentran conviviendo con éstas (Landman WJ y Cornelissen RA, 2006).

Una terapia antimicrobiana eficiente depende esencialmente de la relación exacta que se logre entre un diagnóstico preciso y oportuno por un lado y por el otro, la administración a tiempo del fármaco adecuado, a la dosis ideal, por la mejor vía útil para el caso y para el principio activo en particular y que el tratamiento se realice durante el tiempo necesario (Sumano et al, 2000).

En la crianza de aves de combate es importante analizar el patrón de resistencia a antimicrobianos a través de *Escherichia coli* para poder obtener un panorama general de este fenómeno ya que esta bacteria es un indicador de los mecanismos de resistencia en otras bacterias, lo cual nos llevará a un análisis más profundo para futuros estudios (Carlioni *et al.*, 2011).

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

Importancia del gallo de combate

- Historia

La cultura de los gallos de pelea en México se inicia con la llegada de los españoles en el Siglo XVI. En las playas de la Villa Rica de la Veracruz, a un emisario de Moctezuma, le fue entregado un gallo, como parte de los presentes que incluían espejos y otras cosas. El gallo tuvo un impacto inmediato en el gusto de los nativos, ya que entre los mexicas existía una especial admiración a los animales que destacaban por su agresividad y presencia física, de ahí los hombres-águila y los hombres-jaguar (Guerrero, 2007).

Durante la colonia se fue haciendo más patente esta admiración y gusto por el gallo de pelea, al grado tal que las autoridades determinaron reglamentar este juego (Guerrero, 2007).

- Economía

El médico veterinario zootecnista con especialidad en aves de combate, por desgracia no ha atendido el mercado de los gallos de pelea, una actividad que tiene mucho más potencial económico de lo que algunos piensan y que, además, constituye una importante fuente de empleo (Pérez, 1999).

Las condiciones que requieren estos animales son muy especiales, ya que necesitan instalaciones que son fabricadas por profesionales de la construcción, la alimentación que reciben está hecha bajo estudios en nutrición animal y gente que a través de los años han adquirido conocimientos profundos en la materia, y todos los accesorios necesarios para el combate como navajas, espuelas, jaulas, botanas, botadores, comederos, bebederos, cintas y correas de piel, etc. los cuales son elaborados por verdaderos artesanos expertos mexicanos (Pineda *et al.*, 2015).

Los gallos son también atendidos con vitaminas, minerales, y vacunas, son desparasitados y entrenados en ranchos, granjas o galleras que requieren de servicios como agua, luz, ventilación especial, programas sanitarios y de control de plagas y de roedores. En fin, se requieren muchos elementos para tener buenos gallos de pelea (Talavera *et al.*, 2009).

Para tener una idea de lo que es esta actividad se menciona lo siguiente:

En la República Mexicana existen 2,430 municipios en las 31 entidades federativas sin contar la Ciudad de México, con sus 16 delegaciones; en 116 de estos municipios se encuentran las ciudades y poblaciones más importantes de los Estados, donde se realizan anualmente 1312 días de feria (Guerrero, 2007).

En los restantes 2,314 municipios, se llevan a cabo 23,140 días de feria, con un promedio de 10 días por municipio, sin considerar que en algunos de estos existen varias poblaciones que realizan sus propias festividades donde el evento más trascendente y tradicional suele ser la pelea de gallos. Por otra parte, en México se realizan más de 14,000,000 de casteos de gallos anualmente; como consecuencia se requieren más de 28,000,000 de gallos de los cuales más del 90% son criados en México. A esto se debe agregar que en el país existen más de 400 clubes, peñas o asociaciones de criadores de gallos de pelea que realizan un promedio de 20 eventos por temporada (de noviembre a junio de cada año), con un mínimo de 30 peleas por evento (Guerrero, 2007; INEGI, 2010).

Entre el 85 y 90 por ciento de estos animales son producidos por más de 150 mil criadores distribuidos por todo el país, con concentraciones importantes en los estados de: Aguascalientes, Chihuahua, Coahuila, Guanajuato, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Querétaro, Tamaulipas, Veracruz y Zacatecas (INEGI, 2010).

Su alimentación constituye otro importante aspecto económico a ponderar, pues para alimentar 28,000,000 de gallos con una media de 100g por día de alimento suministrado, esto arroja una venta mensual de alimento especializado de 84,000

toneladas; y tomando en cuenta que el kilogramo de alimento especializado cuesta aproximadamente \$5.75 representa una suma de \$483,000,000.00 de pesos mensualmente (Ornelas, 2007).

A esto se debe agregar el costo que representan medicamentos como: vitaminas, desparasitantes, expectorantes, etc., calculado en ventas anuales de \$250,000,000.00 (Guerrero , 2007).

Por otra parte, en los palenques de las ferias más importantes del país, dependiendo de su relevancia socio económica, implica la movilización de un considerable número de trabajadores durante el periodo que dure la feria, además los visitantes que se alojan, consumen y se transportan representan una derrama económica importante (Pérez ZE, 1999).

Escherichia coli

- Características morfológicas y fisicoquímicas

Escherichia coli fue descubierta en 1885 por Theodor Escherich, quien la denominó inicialmente *Bacterium coli*. El género *Escherichia* comprende cinco especies; *E. blattae*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermanni* y *E. vulneris*. De las cinco especies solamente *E. coli* tiene relevancia clínica tanto en el hombre como en los animales (Machota *et al.*, 2002).

E. coli es una de las especies bacterianas más minuciosamente estudiadas, y no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como sustrato y modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole (Neidhardt, 1999).

Forma parte de la familia Enterobacteriaceae (Cuadro 1) (Ewing, 1985). Está integrada por bacilos Gram negativos no esporulados, móviles con flagelos peritricos o inmóviles, es aerobia o anaerobia facultativa, capaz de crecer en agar MacConkey y en medios simples con o sin NaCl, fermentadores y oxidativos en

medios con glucosa u otros carbohidratos, catalasa positivos, oxidasa negativos, reductores de nitratos a nitritos, y posee una proporción G+C de 39 a 59% en su DNA.

Generalmente son móviles, producen ácido y gas a partir de la glucosa, la arabinosa, y habitualmente de la lactosa y otros azúcares. Producen reacción positiva a rojo de metilo, y negativa a Vogues-Proskauer. Son inhibidos por KCN (cianuro de potasio) e incapaces de crecer en medio con citrato como única fuente de carbono y energía, pero sí en caldo acetato. No producen H₂S, ureasa y fenilalanina negativos, pero en general son indol positivos y decarboxilan la lisina. Se clasifican en más de 170 serogrupos O (somático) según las características antigénicas de su LPS (lipopolisacárido), y en serotipos por la combinación de antígenos O y H (flagelares). Otros antígenos presentes en distintas cepas (capsulares, fimbriales y otros) han sido empleados para su clasificación o identificación (Mollinedo *et al.*, 2014).

- Clasificación

Cuadro 1. Clasificación Taxonómica de <i>Escherichia coli</i>	
Reino	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	<i>Escherichia</i>
Especie	<i>coli</i>

(Fuente: Modificado de Boop *et al.*, 1999)

Hay descritos seis patotipos de *E. coli* productora de diarrea: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena

(EPEC), enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC). Esta no es una clasificación taxonómica, es más bien una clasificación en base a su patogenicidad (Franzolin *et al.*, 2005).

La bacteria se puede aislar e identificar tradicionalmente con base en sus características bioquímicas y serológicas, pero también se puede clasificar en base a sus mecanismos de patogenicidad mediante ensayos en cultivos celulares o modelos animales y, más recientemente, empleando técnicas de biología molecular que evidencian la presencia de genes involucrados en dichos mecanismos (Maheux *et al.*, 2009).

Para determinar el serogrupo al que pertenecen, Kauffman desarrolló un esquema de serotipificación que continuamente varía y que actualmente tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno "O" es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular como se indica en el cuadro 2 (Rodríguez, 2002).

Prevalencia de la resistencia a antibióticos a través de la susceptibilidad de *Escherichia coli* en aves de combate en el norte del Estado de México

Cuadro 2.- Serotipos y serogrupos más comunes de *Escherichia coli* causante de diarrea

ETEC	EIEC	EPEC	EAEC	STEC				
O6:H-	O28ac:H-	O18	O3:H2	O1:MN	O23:H7	O85:H10	O117:H7	O165:H-
O6:H16	O29:H-	O26:H-	O15:H18	O1:H1	O23:H16	O85:H23	O117:H7:K1	O165:H10
O8:H-	O112ac:H-	O26:H11	O44:H18	O1:H2	O25:H-	O86:H10	O117:H14	O165:H19
O11:H27	O124:H-	O55:H-	O77:H18	O1:H20	O25:H11	O88:H-	O117:H19	O165:H25
O15:H11	O124:H7	O55:H6	O86:H-	O1:HNT	O26:H-	O91:H-	O118:H16	O166:H15
O20:H-	O124:H30	O55:H7	O111:H21	O2:H1	O26:H2	O91:H10	O118:H30	O166:H28
O25:H-	O135:H-	O86:H-	O127:H2	O2:H2:K1	O26:H8	O91:H14	O119:H-	O168:H-
O27:H-	O143:H-	O86:H34	ONT:H10	O2:H6	O26:H11	O91:H21	O119:H5	O169:H-
O27:H7	O144:H-	O111:H-		O2:H7	O26:H21	O98:H-	O120:H19	O171:H2
O27:H20	O152:H-	O111ab:H2		O2:H27	O26:H32	O98:H-	O121:H-	O172:H-
O80	O167:H5	O119:H6		O4:H40	O27:H-	O98:H8	O121:H8	OX3:H2
O85:H7		O125ac:H21		O5:H-	O39:H4	103:H-	O126:H-	ONT:H21
O114:H21		O126:H-		O5:H16	O39:H8	O103:H2	O126:H2	ONT:H25
O115:H21		O126:H2		O6:H-	O45:H-	O103:H4	O126:H8	ONT:H28
O126:H9		O126:H27		O6:H1	O45:H2	O103:H6	O126:H21	ONT:H47
O128ac:H27		O127:H21		O6:H29	O45:H7	O103:H25	O126:H27	OR:H-
O139		O128ab:H2		O8:H-	O50:H-	O104:H7	O128:H12	OR:H20
O148:H28		O128:H12		O8:H14	O55:H-	O109:H2	O137:H41	OR:H21
O149:H4		O142:H6		O8:H21	O55:H6	O110:H-	O141:H-	
O149:H10		O158:H23		O9ab:H-	O55:H7	O110:H19	O144:H-	
O153:H45				O11:H49	O55:H10	O111ab:H-	O145:H-	
O159:H-				O14:H-	O55:H?	O111:H2	O145:H16	
O159:H4				O15:H-	O60:H-	O111:H7	O145:H25	
O159:H20				O15:H27	O65:H16	O111ab:H8	O145:H28	
O166:H27				O16:H-	O70:H11	O111:H34	O146:H-	
O167:H5				O16:H6	O73:H34	O111:HNT	O146:H21	
O169:H41				O17:H18	O75:H-	O112:H21	O146:H28	
O173:H-				O18:H-	O75:H5	O113:H2	O150:H10	
				O18:H?	O76:H19	O113:H4	O153:H2	
				O20:H7	O79:H7	O113:H53	O153:H25	
				O21:H5	O80:H-	O114:H4	O154:H-	
				O22:H-	O82:H-	O114:H48	O157:H-	
				O22:H1	O82:H8	O115:H18	O157:H7	
				O22:H8	O83:H1	O116:H19	O161:H-	
				O22:H40	O84:H2	O117:H-	O163:H19	

EIEC E. coli enterotoxigénica
EIEC E. coli enteroinvasiva
NT: no tipificable. EPEC E. coli enteropatógena
EAEC E. coli enteroagregativa
R: rugosa
STEC E. coli productora de toxina shiga

(Fuente: Rodríguez-Ángeles, 2002).

▪ *E. coli* enterotoxigénica (ETEC).

Las ETEC colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias que tienen diversas formas denominadas CFA (colonization factor antigens), siendo su principal mecanismo de patogenicidad la síntesis de alguna o ambas enterotoxinas llamadas toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST). Sus genes están en un plásmido que también puede tener información genética para los CFA's, aunque algunos genes de ST se han encontrado en transposones (Cassels y Wolf, 1995). Las toxinas LT y ST aumentan el nivel intracelular de

AMPc y GMPc respectivamente, que se encuentran en la membrana de las células intestinales, provocando la salida de agua e iones (Sears y Kapper, 1996).

- *E. coli* enterohemorrágica (EHEC).

Se describió y relacionó a EHEC con brotes caracterizados por dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre y poco o nada de fiebre, cuadro al que se le llamó colitis hemorrágica (CH) y que era debido a la ingestión de carne cruda o mal cocida. La bacteria aislada de todos los casos fue *E. coli* serotipo O157:H7. Este serotipo se asoció con casos aislados de síndrome urémico hemolítico (SUH) caracterizado por daño renal agudo, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática, precedida por diarrea con sangre, con la presencia en heces de *E. coli*. Produce una citotoxina con actividad en células Vero, por lo que se le llama verotoxina (VT), y a las cepas capaces de producirla se les denominó *E. coli* verotoxigénicas (VTEC) (Nataro y Kapper, 1998).

Además, se observó que la citotoxina se neutralizó con antitoxina obtenida a partir de *Shigella dysenteriae* tipo1, por lo que también se le llamó “shiga-like toxin” o toxina semejante a shiga (SLT) o “shiga toxin” (STX), y a las *E. coli* capaces de producirla se les da el nombre de STEC (O’Brien *et al.*, 1982).

La citotoxina STX es el principal mecanismo de patogenicidad de EHEC y su síntesis está relacionada con la presencia del bacteriófago STX, que está insertado en el genoma. La STX actúa a nivel de síntesis de proteínas ya que se une a la subunidad 60S de los ribosomas de las células intestinales o renales del hospedero. En las cepas EHEC aisladas, se han encontrado las variantes STX1 y STX2 que son inmunológicamente diferentes, de tal manera que se pueden aislar bacterias que sintetizan alguna de las toxinas o ambas (Cravioto *et al.* 1998; Boop *et al.* 1999). Además de la toxina, las EHEC tienen otros mecanismos de patogenicidad como el fenómeno de adherencia y esfacelación (A/E), y presentan el gene cromosomal (*eae*) que codifica para la proteína de membrana externa

(OMP) de 94 kilodaltones (kDa), llamada intimina, cuya expresión es regulada por genes plasmídicos; el gene *eae* también se encuentra en las cepas EPEC. Otro factor de patogenicidad es el plásmido pO157, de 60 megadaltones (MDa), que codifica para la enterohemolisina (Schmidt *et al.*, 1995).

Actualmente hay al menos dos clasificaciones del grupo EHEC. Una es en función de la presencia de sus factores de patogenicidad: a) cepas típicas cuando tienen el fago, el plásmido de 60 MDa y presentan el fenómeno de A/E, y b) cepas atípicas, cuando no producen lesiones de A/E y pueden presentar o no el plásmido de 60 MDa (Dho-Moulin D *et al.*, 2007).

- *E. coli* enteroinvasiva (EIEC).

El grupo EIEC y *Shigella* spp están relacionados genética y bioquímicamente ya que son descarboxilasa negativas, no móviles y lactosa negativas. El mecanismo de patogenicidad de EIEC es la invasión del epitelio del colon; para ello el primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa requiriendo de mucinasa y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la célula y posterior multiplicación de la EIEC dentro de la célula y diseminación a células sanas adyacentes (Rico-Martínez, 1995). La información genética para este mecanismo está en el loci del cromosoma y del plásmido, además de tener la capacidad de elaborar una o más enterotoxinas que pudieran ser importantes en la producción de diarrea. Los genes necesarios para la invasión se encuentran en un plásmido de 140 MDa llamado *pInV*, que codifica para proteínas, como por ejemplo las *Ipa* y otras que están involucradas en el proceso de patogénesis (Halet *et al.*, 1983; Sethabutr *et al.*, 2000).

- *E. coli* enteropatógena (EPEC).

EPEC fue el primer grupo que se identificó serológicamente y se asoció con casos de diarrea en infantes, es la adherencia su principal factor de patogenicidad. El

proceso de adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de las células del epitelio intestinal, seguida de la destrucción de la microvellosidad, con polimerización de actina, que lleva a la alteración del citoesqueleto en el sitio de la unión de la bacteria, debido al aumento de los niveles de calcio intracelular y de proteína cinasa C, ha sido denominado adherencia y esfacelamiento (A/E). (Eslava C, 2000). La adherencia está mediada por pilis o fimbrias rizadas que se llaman Bfp (bundle-forming pilus) cuya información genética está codificada en un plásmido de 50-70 MDa denominado EAF (EPEC adherence factor) y de algunos genes cromosomales (Donnenberg *et al.*, 1992).

En la adherencia es necesaria la síntesis de una proteína de membrana externa de 94 kDa llamada intimina, codificada por el gene *eae* y que sirve como señal en A/E (Eslava *et al.*, 1994).

- *E. coli* enteroagregativa (EAEC).

Scaletsky y Nataro encontraron cepas aisladas de pacientes con diarrea, las cuales por serología no correspondían al grupo EPEC pero si presentaban un patrón característico de adherencia diferente a EPEC y que además eran negativas a la prueba de EAF. En estudios posteriores se encontró el fenotipo de adherencia agregativa, caracterizada por autoaglutinación de las bacterias entre sí y por ser inespecífica, porque las bacterias se adhieren a la superficie de las células Hep-2 y a la superficie del cubreobjetos libre de células Hep-2 (Eslava C, 2000; Nataro y Kapper, 1998).

La adherencia a células Hep-2 y la hemaglutinación de eritrocitos humanos se debe a la presencia de una fimbria o adhesina flexible llamada fimbria I de adherencia agregativa (AAF/I), codificada por el gene *aggA* que se encuentra en un plásmido de 60 MDa (Dho-Moulin *et al.*, 2007).

También se ha descrito la fimbria AAF/II inmunológicamente diferente a AAF/I y que está codificada por el gene *aafA*; sin embargo, no todas las EAEC presentan estas fimbrias (Nataro *et al.*, 1992; Czeczulin *et al.*, 1997).

En el mecanismo de patogenicidad de EAEC están implicadas la bacteria y diversas moléculas que ella produce; también se sabe que las cepas EAEC tienen la capacidad de incrementar en la mucosa la producción y secreción de moco que atrapa a las bacterias que se autoaglutinan en una fina película en el epitelio intestinal. La producción de moco puede estar relacionada con la capacidad de EAEC para colonizar persistentemente el intestino y causar diarrea (Becerra *et al.*, 2009).

En el plásmido de 60 MDa de EAEC también se encuentran los genes que codifican para la toxina EASTI (Dho-Moulin *et al.*, 2007).

Eslava (1994) y colaboradores identificaron dos proteínas de alto peso molecular en cepas EAEC, aisladas de niños que murieron de diarrea persistente. Estas proteínas fueron probadas en asa ligada de ratón observándose vellosidades intestinales cortas, hemorragia y necrosis. El gen para una de estas proteínas se encontró en un plásmido de 65 MDa y a la proteína se le dio el nombre de Pet (plasmid-encoded toxin) la cual tiene la capacidad de producir efecto citopático en células Hep-2, caracterizado por desprendimiento de las células así como contracción del citoesqueleto y pérdida de fibras de actina. En EAEC se ha descrito también la proteína Pic que está codificada en el genoma y que tiene actividad de proteasa (Eslava *et al.*, 1998; Villaseca *et al.*, 2000).

El sitio blanco de daño de EAEC es la mucosa del intestino grueso y delgado, tiene un periodo de incubación de menos de ocho horas y puede durar hasta 18 o 20 días. Esta bacteria puede causar brotes o casos aislados de diarrea persistente (Becerra *et al.*, 2009).

La prueba de referencia para el diagnóstico de EAEC es la observación de la adherencia agregativa en células Hep-2 previamente inoculados a 37°C, en medio Luria e incubada en condiciones estacionarias (Clavell y Pedrique de Aulacio M, 1992).

- *E. coli* de adherencia difusa (DAEC)

Las cepas de *E. coli* de adherencia difusa, no forman micro-colonias cuando se adhieren a células Hep-2. Se sabe poco de su mecanismo de patogenicidad pero se ha caracterizado una fimbria de superficie, conocida como F1845, involucrada en el fenómeno de adherencia difusa. Los genes que codifican para esta fimbria se pueden encontrar en el cromosoma o en un plásmido. El fenómeno de adherencia difusa también se ha asociado con una proteína de membrana externa de 100 kDa, en una cepa del serotipo 0126:H27, cuyos genes se han secuenciado pero sólo se han encontrado en una minoría de las cepas aisladas (Benz y Schmidt, 1992). Al realizar ensayos *in vitro* en células CaCo y Hep-2, las cepas DAEC tienen la capacidad de inducir la formación de estructuras protuberantes, semejantes a dedos, las cuales confieren protección a las bacterias, pero la presencia de dichas estructuras no se ha demostrado *in vivo*. (Riveros *et al.*, 2011).

Colibacilosis aviar

Es una enfermedad muy importante en avicultura. Supone un serio problema en relación con la salud animal y es una de las principales causas de enfermedad, mortalidad y pérdidas económicas en las granjas avícolas. Este hecho se debe a la frecuencia de su presentación y a la disminución de índices productivos y de bienestar animal (Barnes *et al.*, 2003; Van de Kerchove *et al.*, 2004; Monroy *et al.*, 2005).

La mayoría de los cuadros clínicos de colibacilosis son de origen respiratorio, aunque no se descarta que algunos sucedan al atravesar las bacterias la pared intestinal (Blanco *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 2002; Ewers *et al.*, 2004).

La característica clínica más importante de la colibacilosis aviar es la colisepticemia y se produce por la afectación de numerosos órganos internos, como el corazón, hígado, bazo y ovario entre otros (Gross *et al.*, 1991).

La colibacilosis es sin lugar a dudas la número uno en este complejo, y se refiere a cualquier infección localizada o sistémica causada por completo o de manera parcial por *Escherichia coli*, inclusive colisepticemia, coligranuloma, aerosaculitis o poliserositis fibrino purulenta, celulitis aviar tanto facial (Cabeza hinchada) como abdominal, pericarditis fibrinopurulenta, salpingitis, osteomielitis, tendosinovitis, panoftalmitis, infección del saco vitelino y onfalitis (Barnes y Gross, 1997).

Existe una gran diferencia entre las variedades de *E. coli* y su habilidad para causar enfermedad. Los síntomas varían de acuerdo al lugar preferente de localización de la infección, reconociéndose las siguientes formas:

- Forma respiratoria

La colibacilosis aviar, suele iniciarse a nivel del tracto respiratorio. Cuando *E. coli* atraviesa la mucosa del tracto respiratorio y alcanza el torrente circulatorio, se origina una infección sistémica generalizada o colisepticemia, donde se observan lesiones como perihepatitis, peritonitis y pericarditis fibrinosa (Barnes HJ, *et al.*, 2003; Kariyawasam S. *et al.*, 2002). A nivel respiratorio las lesiones se localizan en la tráquea, pulmones y sacos aéreos, pueden presentar estos últimos un aspecto opaco y con exudado caseoso de intensidad variable (Barnes *et al.*, 2003). Suele afectar a animales jóvenes de forma aguda, alcanzándose valores aproximados del 50% de morbilidad y del 5-10% de mortalidad. Entre los síntomas clínicos que se manifiestan, se puede observar disnea acompañada de estertores.

- Forma reproductiva

La principal vía de infección del oviducto suele producirse por contaminación fecal a partir de la cloaca. También están descritas otras vías de infección como la producida a partir del tracto respiratorio por invasión, diseminación y colonización de órganos internos e incluso por el paso de las bacterias a través del lumen intestinal. Se han descrito casos de infecciones ascendentes desde el oviducto a la cavidad peritoneal, que cursan con peritonitis (Landman y Cornelissen, 2006).

Es una enfermedad crónica y de curso lento, con una mortalidad entre 2-3% en la forma reproductiva. Los rendimientos productivos de las gallinas ponedoras disminuyen ya que se produce una leve caída de la postura (Van de Kerchove *et al.*, 2004). El oviducto presenta una notable congestión y dilatación de la mucosa pudiendo encontrar un contenido purulento en el interior, incluso masas caseosas, en animales mayores.

Antimicrobianos

Los antibióticos son sustancias producidas por varias especies de microorganismos (bacterias, hongos o actinomicetos) o de manera sintética, que suprimen el desarrollo de otros microorganismos y que incluso pueden llegar a destruirlos. Se ha ido comprobando que muchos hongos producen sustancias que actúan como agentes antibacterianos. En 1929, Alexander Fleming aisló y cultivó el hongo *Penicillium* que producía una sustancia causante de la lisis de un cultivo de estafilococos que llamó *penicilina*, el cual podría considerarse el primer antibiótico (Sumano *et al.*, 2000).

Los agentes antimicrobianos pueden interferir en funciones que lleva a cabo la bacteria, tales como la síntesis de ácidos nucleicos, de proteínas o el procesamiento de aminoácidos o azúcares del medio, necesarios para la biosíntesis de la pared o membrana celular. Los antibióticos pueden actuar en una o más áreas del funcionamiento del microorganismo y producir dos principales

efectos: la muerte de la bacteria, designándose entonces como agentes bactericidas o sólo inhibir el desarrollo y reproducción del germen, llamándose entonces agentes bacteriostáticos (Rodríguez *et al.*, 2000).

Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo, tienen elevada potencia biológica que actúa a bajas concentraciones y la toxicidad es selectiva, con una mínima toxicidad para las células del organismo. El objetivo de la terapia con antibióticos es controlar y disminuir el número de bacterias (Matute, 2008).

En la práctica diaria, una buena parte de los tratamientos efectuados tanto a nivel de campo como clínico, se establecen con arreglo a criterios derivados de estudios *in vitro* del comportamiento de las distintas especies bacterianas frente a un determinado grupo de antibióticos (tratamiento empírico). Ello se debe a que en muchas ocasiones, no puede disponerse de la bacteria aislada del proceso infeccioso y la elección terapéutica, en esos casos, responde a criterios de empirismo, derivados precisamente del conocimiento del comportamiento de distintos tipos de antibióticos frente a las bacterias presuntamente responsables de la infección (Archer y Polk, 2006).

Por otra parte, cada vez es más necesario contar con un programa de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos, a nivel general, basado precisamente en el conocimiento tanto a nivel clínico como de campo, se debe entender el comportamiento de los distintos aislamientos de bacterias frente a los antimicrobianos para poder diseñar las estrategias que tiendan a superar la resistencia de las mismas a los antibióticos (Noriega, 2004).

También es necesario contar no solamente con criterios de tipo cuantitativo o cualitativo (sensible, intermedio, resistente), sino que además los resultados deben de interpretarse adecuadamente para evitar llegar a conclusiones erróneas

que pueden derivarse de atender exclusivamente al dato que el antibiograma ofrece, ya que existen muchas formas de interrelación bacteria-antibiótico que deben conocerse para llegar a ese objetivo final que es la elección de la terapia más adecuada (Calderwood y Moellering, 1988).

En líneas generales y en función sobre su forma de actuar sobre los microorganismos, existen dos grandes grupos de antibióticos:

Bactericidas: Ejercen una acción letal e irreversible sobre la bacteria (Fosfomicina, Vancomicina, B-Lactámicos, Polimixina, Aminoglucósidos, Rifampicina, Ácido Nalidíxico, Quinolonas, fluoroquinolonas y Nitrofurantoinas) (Groos *et al.*, 2012).

Bacteriostáticos: Inhiben el crecimiento pero no matan al microorganismo, permitiendo que las propias defensas del hospedero puedan eliminar a las bacterias (Tetraciclina, Cloranfenicol, Sulfonamidas Trimetoprim, Lincomicina, Clindamicina, Macrólidos) (Groos *et al.*, 2012).

- Administración del antibiótico

Es claro que en avicultura comercial se medica primariamente por vía oral, en el agua de bebida o en el alimento y excepcionalmente por vía IM o SC.

Existen descripciones detalladas de que la calidad del agua es necesaria para tener un tratamiento eficiente (Russeld, 1992). Vale la pena destacar algunos razonamientos, es un hecho que la presencia de materia orgánica y/o carga bacteriana reduce drásticamente la actividad de una gran variedad de antibacterianos (Sumano *et al.*, 2000; Wages, 1997). Así que la potabilización del agua de bebida no es únicamente cuestión de higiene. A mayor dureza del agua mayor inactivación de la inmensa mayoría de los antibacterianos aunque para algunos dicha inactivación es mucho más evidente para oxitetraciclina, clortetraciclina, amoxicilina, ampicilina (Sumano *et al.*, 2000, Sumano y Gutiérrez, 2000).

Según su mecanismo de acción, los antibióticos se clasifican de la siguiente manera:

1. Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular. Las bacterias son microorganismos hiperosmolares con respecto a los tejidos y al líquido intersticial de los mamíferos, por tanto, para mantener su integridad necesitan una pared celular rígida (Matute, 2008).

La inhibición de la síntesis de la pared bacteriana tiene habitualmente un efecto bactericida. La estructura de la pared celular es un polímero denominado peptidoglicano, cuya síntesis se divide en 3 etapas principales, cada una de éstas es inhibida por un grupo de antibióticos diferentes (Groos *et al.*, 2012).

En la primera etapa se forma el UDP-N-acetilmunamil-pentapéptido en el citoplasma bacteriano (Sande y Mandell, 1982). En la segunda etapa, se polimerizan el UDP-N-acetilmuramil-pentapéptido y la N-acetilglucosamina que son transportados a través de la membrana citoplasmática y se unen al punto de crecimiento de la pared bacteriana (Neu, 1987).

Esta fase es inhibida por antibióticos como la vancomicina y la bacitracina. Por último, las cadenas de peptidoglicano, una vez fuera de la célula, quedan entrelazadas transversalmente y dan lugar a la formación de un polímero tridimensional, esta etapa, también conocida como reacción de transpeptidación es inhibida por las penicilinas y las cefalosporinas (Calderwood, 1988).

2. Antibióticos que ejercen su acción a través de la membrana celular y afectan su permeabilidad. La membrana citoplasmática es fundamental para la regulación del medio intracelular de la bacteria (Jawetz, 1989). Esta membrana es diferente para las bacterias y los hongos y puede lesionarse por algunos antibióticos, de esta forma se obtiene una actividad antimicrobiana selectiva; antibióticos como polimixina, pristanamicina y anfotericín B poseen esta acción. Las polimixinas, tienen una afinidad especial para los receptores de polifosfatos situados en la

membrana celular de las bacterias, producen toxinas, que si bien son letales para la bacteria, no es tóxico para el paciente (Van der Broek, 1989).

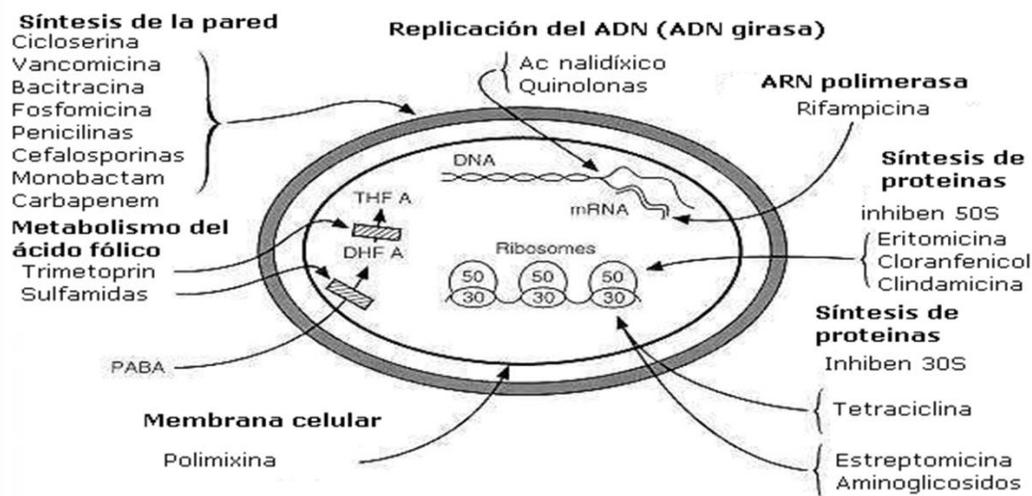
3. Fármacos que inhiben la síntesis proteica (es decir, inhibición de la traducción y transcripción del material genético).

Algunos antibióticos (cloranfenicol, lincomicina, aminoglucósidos y las tetraciclinas) son capaces de inhibir la síntesis de las proteínas en las bacterias.

El ribosoma bacteriano es más pequeño que el de los mamíferos, consta de 2 subunidades denominadas 50s y 30s; el antibiótico se une a los ribosomas bacterianos y bloquean la acción del RNA mensajero, este bloqueo en ocasiones es reversible. En el caso de los aminoglucósidos, éstos se unen a la subunidad ribosomal 30s y producen la acumulación de complejos iniciales de la síntesis proteica, lectura errónea del código RNAm y producción de polipéptidos anormales que se comportan como bactericidas (Rincón *et al.*, 2000).

4. Inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos. Las fluoroquinolonas, sulfonamidas, rifampicín, novobiocina y los nitroimidazoles actúan por este mecanismo al inhibir de forma selectiva, la enzima RNA polimerasa dependiente del DNA, lo cual cataliza la transcripción de la información genética contenida en el RNA mensajero y se convierte así en un potente bactericida (Calvo y Martínez-Martínez, 2009). Estos mecanismos de acción se muestran en la Figura 1.

Figura 1.- Mecanismos de Acción de los Distintos Antimicrobianos



(Fuente: Modificado de Calvo y Martínez-Martínez, 2009).

Resistencia Bacteriana

La resistencia a los antibióticos representa un problema a nivel mundial no sólo en cuanto a su diagnóstico y descubrimiento temprano sino también en cuanto a su manejo y control. Por esta razón instituciones como la Organización Mundial de la Salud (OMS), el Centro de Prevención y Control de Enfermedades (CDC) y otras a nivel europeo, han diseñado nuevos programas y sistemas de vigilancia de la resistencia bacteriana. Asimismo, se ha solicitado que cada país tenga un programa de vigilancia nacional y local para poder realizar un mejor control de este fenómeno (OMS, 2015).

El problema de la resistencia constituye un factor que conduce a cambios permanentes en la prescripción antibiótica y está en función del tiempo y el uso de un antimicrobiano (Brito *et al.*, 2011). La OMS publicó su primera lista de «patógenos prioritarios» resistentes a los antibióticos, en la que se incluyen las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana se elaboro para tratar de guiar y promover la investigación y desarrollo de nuevos para combatir el

creciente problema mundial de la resistencia a los antimicrobianos dividiéndola en prioridad 1: Crítica (*Acinetobacter baumannii* *Pseudomonas aeruginosa*), resistente a los carbapenémicos; prioridad 2: Elevada (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*) y prioridad 3: Media (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Shigella* spp) resistentes a penicilinas (OMS, 2017).

La resistencia a los antibióticos es una expresión natural de la evolución y genética bacteriana, ciertos factores también contribuyen al aumento de la expresión y diseminación de esta característica inherente (Cabrera *et al.*, 2007).

La resistencia bacteriana se define como la capacidad de un microorganismo para desarrollar mecanismos de defensa contra la acción de los antibióticos. Multirresistencia se define como la capacidad adquirida por los gérmenes contra diferentes agentes antimicrobianos (Vargas *et al.*, 2010).

La resistencia a múltiples sustancias es un problema de salud pública que se viene observando a nivel mundial después de la aparición de los antibióticos. Fenómeno creciente caracterizado por una refractariedad parcial o total de los microorganismos al efecto del antibiótico generado principalmente por el uso indiscriminado e irracional de éstos y no sólo por la presión evolutiva que se ejerce en el uso terapéutico (Cabrera *et al.*, 2007).

La aparición de bacterias resistentes propicia la persistencia de cepas resistentes, entrando así en una historia interminable. Sin lugar a dudas, uno de los principales problemas que se han empezado a enfrentar en el ámbito de la salud consiste en la creciente y cada vez más preocupante cantidad de enfermedades bacterianas ocasionadas por cepas resistentes a diversos antimicrobianos, lo cual se traduce en lapsos más prolongados de improductividad, en el peligroso agravamiento de las patologías y en mayores índices de contagio y mortalidad (Groos *et al.*, 2012).

El incremento en el uso de antibióticos y la respectiva presión selectiva que ejercen, es el factor más importante que contribuye a la aparición de diversas clases de resistencia bacteriana (Becerra *et al.*, 2009).

Las bacterias encontradas en los animales y en los alimentos de origen animal, al igual que las aisladas de humanos, también codifican complejos mecanismos de resistencia antimicrobiana como enzimas de hidrólisis y modificantes, bombas de eflujo, mutaciones en porinas de membrana, biofilms y elementos genéticos móviles (Vargas *et al.*, 2010).

Mecanismos de Resistencia de las Bacterias

Las bacterias, por su gran capacidad de adaptación, pueden desarrollar mecanismos de resistencia frente a los antibióticos. Existe una resistencia natural o intrínseca en las bacterias si carecen de diana para un antibiótico. La resistencia adquirida es la realmente importante desde un punto de vista clínico: es debida a la modificación de la carga genética de la bacteria y puede aparecer por mutación cromosómica o por mecanismos de transferencia genética. La primera puede ir seguida de la selección de las mutantes resistentes (rifampicina, macrólidos), pero la resistencia transmisible es la más importante, esta mediada por plásmidos, transposones o integrones, que pueden pasar de una bacteria a otra del mismo o diferente género y especie (Daza, 1998).

Mecanismos de transferencia de material genético que generan la resistencia bacteriana:

- Conjugación.

Las bacterias con frecuencia contienen elementos genéticos extracromosómicos llamados plásmidos, muchos de los cuales llevan genes de resistencia antimicrobiana. Cuando dos células bacterianas se encuentran cerca, una estructura similar a un puente conocida como pili sexual se puede formar entre ellas. Esto permite que una copia del plásmido se replique y transfiera de una

célula a otra. El resultado es una bacteria que expresa la resistencia antimicrobiana codificada en el plásmido (Calvo y Martínez -Martínez, 2009).

- Transformación.

Las bacterias podrían encontrar fragmentos desnudos de ADN que transportan genes de resistencia antimicrobiana. Estos fragmentos son introducidos en la célula mediante un proceso denominado transformación. El fragmento de ADN es incorporado en el cromosoma de la célula hospedera por recombinación y la célula resultante es resistente (Becerra *et al.*, 2009).

- Transducción.

Cuando los virus bacterianos (bacteriófagos) se están multiplicando en el citoplasma de una bacteria, fragmentos de ADN de plásmidos o cromosomas pueden por casualidad anexarse en una cápsula viral y entrar en otra célula hospedera. Cuando los fragmentos contienen genes de resistencia a un antimicrobiano, estos pueden transmitir material genético a la nueva célula hospedera (González *et al.*, 2004).

- Transposición.

Los transposones son secuencias genéticas especializadas “móviles” que tienen la capacidad de moverse de un área del cromosoma bacteriano a otra o entre cromosomas y plásmidos o ADN de bacteriófagos. Los transposones de ADN pueden estar incorporados a plásmidos y de esa manera transportar genes de resistencia antimicrobiana. Algunos transposones son capaces de moverse de una bacteria a otra sin incorporarse a un cromosoma, un plásmido o un bacteriófago (Cavalieri, 2005).

Las bacterias se hacen resistentes a los antibióticos desarrollando mecanismos de resistencia que impiden al antibiótico ejercer su mecanismo de acción. Los mecanismos de resistencia de las bacterias son fundamentalmente tres:

1) Inactivación del antibiótico por enzimas: La bacteria produce enzimas que inactivan al antibiótico; las más importantes son las betalactamasas y muchas bacterias son capaces de producirlas. En las Gram positivas suelen ser plasmídicas, inducibles y extracelulares y en las Gram negativas son de origen plasmídico o por transposones, constitutivas y periplásmicas. También hay enzimas modificantes de aminoglucósidos y aunque no es éste su principal mecanismo de resistencia, también el cloranfenicol, las tetraciclinas y los macrólidos pueden ser inactivados por enzimas.

2) Modificaciones bacterianas que impiden la llegada del antibiótico al punto diana: Las bacterias producen mutaciones en las porinas de la pared que impiden la entrada de ciertos antibióticos (betalactámicos) o alteran los sistemas de transporte (aminoglucósidos en las anaerobias). En otras ocasiones pueden provocar la salida del antibiótico por un mecanismo de expulsión activa, impidiendo que se acumule en cantidad suficiente para que actúe eficazmente.

3) Alteración por parte de la bacteria de su punto diana, impidiendo o dificultando la acción del antibiótico. Se manifiestan alteraciones a nivel del ADN girasa (resistencia de quinolonas), del ARNr 23S (macrólidos) de las enzimas PBPs (proteínas fijadoras de penicilina) necesarias para la formación de la pared celular (resistencia a betalactámicos).

Una misma bacteria puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o muchos antibióticos y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos de diversas especies bacterianas, todo lo cual complica sobremanera el estudio de las resistencias de las bacterias a los distintos antimicrobianos.

Antibiograma por difusión en agar

Los antibiogramas son métodos *in vitro* que determinan la susceptibilidad de los microorganismos a una variedad de agentes antimicrobianos, bajo condiciones de

laboratorio específica y estandarizada. La meta principal del estudio de susceptibilidad es proveer al clínico algunas recomendaciones sobre la terapia que puede ser más apropiada en pacientes con una infección específica. No obstante, la correlación exacta entre los resultados *in vitro* y la respuesta clínica es muchas veces difícil de predecir, ya que existen numerosos factores que influyen la interacción de los agentes antimicrobianos y los microorganismos en un determinado paciente (Clavell *et al.*, 1992).

Los objetivos del antibiograma son:

Medir la sensibilidad de una cepa bacteriana que se sospecha es la responsable de una infección a uno o varios antibióticos. La sensibilidad *in vitro* es uno de los requisitos previos para la eficacia *in vivo* de un tratamiento antibiótico. El antibiograma sirve, en primer lugar, para orientar las decisiones terapéuticas individuales.

El segundo objetivo del antibiograma es el de seguir la evolución de las resistencias bacterianas. Gracias a este seguimiento epidemiológico, a escala de un servicio, un centro de atención médica, una región o un país, es como puede adaptarse la antibioterapia empírica, revisarse regularmente los espectros clínicos de los antibióticos y adoptar ciertas decisiones sanitarias, como el establecimiento de programas de prevención (Palavecino, 1997).

Fundamento

El antibiograma disco-placa basado en el trabajo de Kirby Bauer, y colaboradores es uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards recomendado para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos (NCCLS, 2006). El antibiograma disco-placa consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto

con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico se difunde al agar.

El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La concentración de antibiótico en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución. Sin embargo, los métodos disco-placa no permiten una lectura directa del valor de la CMI. Para cuantificarla, basta con haber contrastado previamente el sistema disco-placa con un gran número de cepas de CMI conocidas que han estado previamente determinadas por otros métodos de determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos (ej.: método de dilución) (Rodríguez *et al.*, 2000).

Esta determinación se realiza con cientos de bacterias para minimizar errores. Se mide el diámetro de la zona de inhibición obtenida por cada una de tales cepas y se grafica dicha medida frente a la CMI, obteniéndose la línea de regresión o "recta de concordancia" que proporciona la correspondencia entre las CMI y los diámetros de inhibición. Para determinar la CMI de una cepa se procede a medir el diámetro de la zona de inhibición y luego extrapolarlo en el gráfico para obtener la CMI. Existen, por tanto, unos diámetros de inhibición, expresados en mm, estandarizados para cada antimicrobiano. La lectura de los halos de inhibición debe interpretarse como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) según las categorías establecidas por el NCCLS (Navarro *et al.*, 2002).

Ahora bien en la producción de aves de combate no hay datos relevantes de la resistencia bacteriana sin embargo podemos considerar a la bacteria *E. coli* como un indicador y captador de los mecanismo de resistencia. Es por eso que se puede usar para realizar estudios sobre la resistencia a los antibióticos y así generar una importante fuente de información que ayudará a estudiar el patrón de

la resistencia y contribuirá con la antibiótico-terapia en las aves de combate
(Landman y Cornelissen, 2006).

III.JUSTIFICACIÓN

En los últimos años la utilización terapéutica de antimicrobianos en medicina veterinaria en donde no se excluyen las aves de combate ha sido indiscriminada, paradójicamente, el uso insuficiente debido a falta de acceso, dosis inadecuadas, incumplimiento o productos de mala calidad pueden ser tan importantes en cuanto a la resistencia como el uso excesivo. La problemática que se tiene con el aumento de la resistencia bacteriana es que provoca pérdidas económicas importantes para las personas que dependen de este fin zootécnico y que puede llevar a la muerte de las aves.

Con el uso inadecuado de los antimicrobianos, la prevalencia de la resistencia ha ido aumentando. Si bien este fenómeno varía de una zona geográfica a otra y también a lo largo del tiempo, lo cierto es que tarde o temprano todo antimicrobiano genera resistencia, lo que es un problema para los Médicos Veterinarios ya que para alcanzar el éxito en los tratamientos de enfermedades bacterianas es necesario el uso de nuevos y diferentes antibióticos.

La atención que se les brinda a las aves de combate es principalmente de tipo empírico, implementado tratamientos que usan los pastores o los dueños que no cuentan con los conocimientos científicos y técnicos suficientes; sin embargo, la atención que se les debe de proporcionar a este tipo de aves debe ser con conocimiento profesional. Es necesario que los Médicos Veterinarios estén capacitados para brindar un tratamiento adecuado y así reducir la resistencia a los antibióticos.

La falta de información y datos epidemiológicos acerca de la resistencia antimicrobiana en aves de combate en México es la razón principal por la que se requiere determinar la prevalencia de la resistencia a antibióticos a través de la susceptibilidad de *Escherichia coli* en aves de combate en el Norte del Estado de México, ya que se sabe que esta bacteria adquiere y transmite mecanismos de resistencia a otras bacterias del mismo e incluso a diferentes géneros y es capaz

de transferir la resistencia a otras especies animales, incluso al ser humano, lo cual es una preocupación para la salud pública.

Actualmente hay pocos Médicos Veterinarios que otorguen el servicio veterinario de calidad a las aves de combate que es una especie productiva y merecen al igual que otras la atención del gremio, por lo cual es necesario investigar y aportar información sobre la resistencia a los antibióticos en los gallos de pelea.

IV.HIPÓTESIS

Existe una resistencia mayor al 25% a los antimicrobianos más comúnmente usados en la clínica de aves en cepas de *E. coli* a partir de muestras aisladas en aves de combate en el Norte del Estado de México.

V.OBJETIVO

❖ General

- Determinar la prevalencia de la resistencia a los antimicrobianos de las cepas de *E. coli* aisladas a partir de aves de combate en el Norte del Estado de México, en los municipios de Atlacomulco y El Oro.

❖ Específicos

- Aislar e identificar mediante el uso de medios de cultivo y pruebas bioquímicas a *Escherichia coli*, en muestras obtenidas de aves de combate en los municipios de El Oro y Atlacomulco.
- Determinar el patrón de resistencia mediante la prueba Kirby-Bauer, a diversos antimicrobianos de *Escherichia coli* a antimicrobianos en aves de combate del Norte del Estado de México.
- Comparar la sensibilidad *in vitro* de las muestras de aves de combate obtenida de los municipios El Oro y Atlacomulco.

VI.MATERIAL

1. Biológico

- Cepa de referencia *Escherichia coli* ATCC® 25922
- Cepas de *E. coli* de campo (197 cepas)

2. Equipo de laboratorio

- Autoclave
- Estufa bacteriológica
- Balanza analítica
- Vórtex

3. Cristalería

- Tubos de ensaye con tapa de rosca
- Matraz 500 ml y 1l
- Pipeta graduada 10ml

4. Medios de cultivo

- Agar Mc Conkey
- Agar Müeller Hinton (MH)
- Agar Infusión Cerebro-Corazón (BHI)
- Agar Hierro y Triple Azúcar (TSI)
- Agar Hierro y Lisina (LIA)
- Agar Citrato de Simmons

- Agar Sulfuro Indol Movilidad (SIM)
 - Medio Movilidad Indol Ornitina (MIO)
 - Medio de transporte de Stuart
5. Soluciones y reactivos
- Glicerol
 - Sensidiscos (Multidiscos Gram Negativos, Bio Rad R No. de catálogo 71080280, 12 antimicrobianos)
 - Alcohol al 70%
6. Otros
- Hisopos estériles
 - Asa bacteriológica
 - Mechero
 - Cajas Petri desechables
 - Pinzas
 - Gradillas
 - Vernier
 - Micropipetas de 1000 μ L, 200 μ L y 50 μ L
 - Puntas para micropipetas (amarillas y azules)
7. Equipo personal de bioseguridad
- Guantes de látex

- Cubrebocas
- Bata

VII.METODOLOGÍA

El estudio se llevó a cabo en galleras que se encuentran afiliadas a la Federación Mexicana de Criadores de Gallos de Pelea A. C. en los Municipios de Atlacomulco y El Oro, Estado de México.

➤ Tamaño de muestra

El tamaño de muestra se determinó considerando una prevalencia de 25% (Brito *et al.*, 2011), con un nivel de confianza de 95% y un error estimado de 5%, según la siguiente fórmula:

$$n = \frac{N Z^2 pq}{d^2 (N-1) + Z^2 pq}$$

Dónde:

N= número de animales total

$$Z^2 = 1.96$$

p= prevalencia esperada

$$q = 1 - p$$

d² = error estimado

$$n = \frac{740 (1.96)^2 (0.25)(0.75)}{(0.05)^2 (740-1) + (1.96)^2 (0.25)(0.75)} = 207$$

El resultado de aplicar la anterior formula es 207, por lo que el número mínimo de aves a muestrear es de 207.

Se utilizó un muestreo aleatorio simple por conveniencia utilizando estratos por municipios (Atlacomulco y El Oro) y subestratos utilizando número de unidad de

producción de acuerdo al porcentaje que cada uno aporta del total de la población como se describe en la tabla 3, 4 y 5 (Jaramillo y Martínez, 2009).

Muestra dividida por Municipios:

Cuadro 3. Población total de aves de galleras que se encuentran afiliadas a la Federación Mexicana de Criadores de Gallos de Pelea en los Municipios de Atlacomulco y El Oro.		
Municipios	Numero de aves	Muestra de la población (%)
Estrato A (Atlacomulco)	460	62%
Estrato B (El Oro)	280	38%
Total	740	100%

(Fuente: Datos originales)

Cuadro 4. Número de aves a muestrear en el municipio de Atlacomulco. Estrato A			
Subestratificación	Población (N)	Porcentaje (%)	Muestras (n)
Socio 1	50	10.8	17
Socio 2	40	8.6	13
Socio 3	50	10.8	17
Socio 4	200	43.4	66
Socio 5	40	8.6	13
Socio 6	46	10	15
Socio 7	20	4.3	7
Socio 8	20	4.3	7
Total	460	100	155

(Fuente: Datos originales)

Cuadro 5. Número de aves a muestrear en el municipio de El Oro. Estrato B

Subestratificación	Población (N)	Porcentaje (%)	Muestras (n)
Socio 9	30	10.7	10
Socio 10	20	7.1	7
Socio 11	50	17.8	17
Socio 12	30	10.7	10
Socio 13	100	35.7	33
Socio 14	50	17.8	17
Total	280	100	94

(Fuente: Datos originales)

Análisis estadístico

Los resultados fueron evaluados utilizando estadística descriptiva a través de cuadros y gráficas y una prueba de hipótesis para evaluar la diferencia de resistencia entre los municipios estudiados con un nivel de confianza de 95% y un error experimental de 5% .

➤ Obtención de la muestra:

Las muestras se obtuvieron con hisopos estériles directamente de la cloaca de aves de combate y sementales, machos descartados aparentemente sanos con previa evaluación médica. La edad aproximada de las aves fue entre las 18 y 24 meses de edad.

➤ Transporte de la muestra

Una vez realizada la toma de muestra, los hisopos se colocaron en medios de transporte Stuart y se mantuvieron en refrigeración a 4° C, para ser transportados al Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal de la FMVZ/UAEMex.

➤ Aislamiento e identificación bacteriológica

Los hisopos se colocaron en 3 ml de caldo peptonado, se incubaron a 37° C por 18 horas en la estufa bacteriológica, posteriormente se homogenizó cada tubo y fue sembrado por estría en placas con agar MacConkey. Se incubaron las placas por un período de 18 a 24 horas a 37°C. Las colonias rojas o rosas sospechosas de *Escherichia coli* fueron sometidas a pruebas bioquímicas con la finalidad de diferenciarlas correctamente de otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Cuadro 6).

Cuadro 6. Pruebas Bioquímicas realizadas a las muestras		
Características Bioquímicas	<i>E. coli</i>	Prueba o medio de cultivo
Conformación de la pared celular	Gram - (color rojo o rosa)	Tinción de Gram
Conformación de la pared celular	Gram - (formación de una hebra)	Prueba KOH
Fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa	+	Agar hierro y triple azúcar (TSI)
Formación de ácido sulfhídrico	-	TSI
Producción de gas	+	TSI, Agar hierro y lisina (LIA)
Utilización de citrato	-	Agar citrato de Simmons

Producción de indol	+	Agar Sulfuro indol movilidad (SIM); movilidad, indol, ornitina (MIO)
Movilidad	Móvil	SIM, MIO
Actividad lisina descarboxilasa	+	LIA
Actividad ornitina descarboxilasa	+	MIO
Actividad ureasa	-	Agar urea

(Fuente: Modificado de Rodríguez, 2002).

➤ Conservación de las cepas

Las colonias de *E. coli* que resultaron positivas a las pruebas bioquímicas se conservaron en críoviales con 80% de caldo de infusión cerebro corazón (BHI), y 20% de glicerol, manteniéndolas en congelación a -70° C para posteriores estudios.

➤ Prueba de Sensibilidad antimicrobiana *in vitro*

La prueba de sensibilidad antimicrobiana *in vitro* se realizó por el método Kirby Bauer de difusión con sensidiscos. Se emplearon los siguientes antibióticos: Amikacina AK (30µg), Ampicilina AM (10µg), Carbenicilina CB (100µg), Cefalotina CF (30µg), Cefotaxima CTX (30µg), Ceftriaxona CRO (30µg), Cloranfenicol CL (30µg), Gentamicina GE (10µg), Netilmicina NET (30µg), Nitrofurantoína NF (30µg), Pefloxacina PEF (5µg) y Trimetroprim-Sulfametoxazol SXT (25µg) (Sensidiscos, Gram negativos BIO-RAD).

Se preparó un inóculo bacteriano de cada cepa en tubos de ensaye con caldo Müeller Hinton con un patrón de turbidez de 0.5 en la escala de McFarland lo que equivale aproximadamente de 1 a 2 x 10⁸ unidades formadoras de colonias (CFU) de *E. coli*; se introdujo un hisopo estéril de algodón y sumergiendo completamente en el tubo de ensaye, antes de retirarlo se debe comprimir en las paredes del tubo para evitar el exceso de líquido (NCCLS, 2006).

En la placa de MH se estrío el hisopo con la suspensión de bacteria sobre la superficie de forma paralela y compacta, repitiendo por tres veces más, rotando la placa 60 grados aproximadamente para asegurar una distribución homogénea del inóculo, finalmente se barrió el hisopo en el borde de la placa, dejando secar entre 2-3 minutos (NCCLS, 2006).

Una vez seco el inóculo se procedió a colocar los multidiscos con una pinza estéril, se presionó cada disco suavemente para asegurar el contacto con el agar, después se invirtieron las cajas Petri y se llevaron a incubar por 18 horas a 37° C (NCCLS, 2006).

Se llevó a cabo la lectura midiendo el diámetro del halo de inhibición en mm con un vernier. Las cepas se clasificaron en tres categorías: Resistentes (R), Intermedias (I), o Sensibles (S), de acuerdo a los estándares del NCCLS (NCCLS, 2006). Los antimicrobianos a emplear, su dosis y la interpretación se muestra en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Interpretación del diámetro del diámetro en mm de la prueba de difusión en disco.

Clase o grupo de Antimicrobianos	Agente Antimicrobiano	Abreviación	Contenido del sensidisco (µg)	Diámetro (mm)		
				R	I	S
Aminoglucósido	Amikacina	AK	30	≤14	15-16	≥17
β-lactámico	Ampicilina	AM	10	≤13	14-16	≥17
β-lactámico	Carbenicilina	CB	100	≤19	20-22	≥23
β-lactámico	Cefalotina	CF	30	≤14	15-17	≥18
β-lactámico	Cefotaxima	CTX	30	≤14	15-22	≥23
β-lactámico	Ceftriaxona	CRO	30	≤13	14-20	≥21
Fenicol	Cloranfenicol	CL	30	≤12	13-17	≥18
Aminoglucósido	Gentamicina	GE	10	≤12	13-14	≥15
Aminoglucósido	Netilmicina	NET	30	≤12	13-14	≥15

Prevalencia de la resistencia a antibióticos a través de la susceptibilidad de *Escherichia coli* en aves de combate en el norte del Estado de México

Nitrofurano	Nitrofurantoína	NF	300	≤14	15-16	≥17
Fluoroquinolona	Pefloxacina	PEF	5	≤14	15-22	≥23
Diaminopirimidina-Sulfonamida	Trimetoprim-Sulfametoxazol	SXT	25	≤10	11-15	≥16

(Fuente: Modificado de Aguilar, 2011)

VIII.LÍMITE DE ESPACIO

Los muestreos se realizaron en los municipios de Atlacomulco que se ubica en la zona norte del Estado de México, se localiza a 19° 43' 37" de latitud norte y 99° 42' 12" de latitud oeste y en el municipio de El Oro que se ubica en el Norte del Estado de México, localizado a 19° 48' 03" de latitud norte y 100° 07' 53" de latitud oeste.

El trabajo de laboratorio se realizó en el área de Microbiología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), ubicado en el Campus El Rosedal, San Cayetano, Carretera Toluca-Atlacomulco Km. 15.5 de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México.

IX.LÍMITE DE TIEMPO

Este trabajo tuvo una duración de ocho meses aproximadamente, considerando desde el desarrollo del protocolo, el tiempo dedicado al muestreo, procesamiento de muestras en el laboratorio, análisis de resultados, realización de tablas y gráficas correspondientes y por último la obtención de conclusiones y la redacción del documento (Cuadro 8)

Cuadro 8. Cronograma de Actividades				
	Febrero - Marzo	Abril - Mayo	Junio - Julio	Agosto - Sept
Búsqueda de información Desarrollo del protocolo	*			
Recolección de muestras	*			
Procesamiento de muestras	*	*		
Análisis de resultados			*	
Conclusión del trabajo de campo y de laboratorio			*	
Discusión, conclusiones, sugerencias y redacción del trabajo final				*

X.RESULTADOS

De los 197 aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos de 207 aves de combate muestreadas en los municipios de Atlacomulco y El Oro se encontró que algunos β -lactámicos como carbenicilina y ampicilina, además de trimetoprim-sulfametoxazol fueron los antimicrobianos que en las bacterias aisladas presentaron un mayor porcentaje de resistencia.

Las cepas aisladas obtenidas de aves de combate en los municipios de Atlacomulco y El Oro que presentaron mayor resistencia a los antibióticos fueron; carbenicilina 55.8%, ampicilina 55.3%, en orden descendente le sigue el trimetoprim-sulfametoxazol 52.2%, cefalotina 42.1%, cloranfenicol 29.9%, gentamicina 25.8%, nitrofurantoína 25.3%, amikacina 19.7%, pefloxacina 18.7%, cefotaxima 18.2%, netilmicina 14.7% y ceftriaxona 0.5% (Cuadro 9, Figura 2).

Cuadro 9. Patrón de sensibilidad *in vitro* de *Escherichia coli* de aves de combate (n=197) mediante la prueba de difusión en agar en los municipios de Atlacomulco y El Oro.

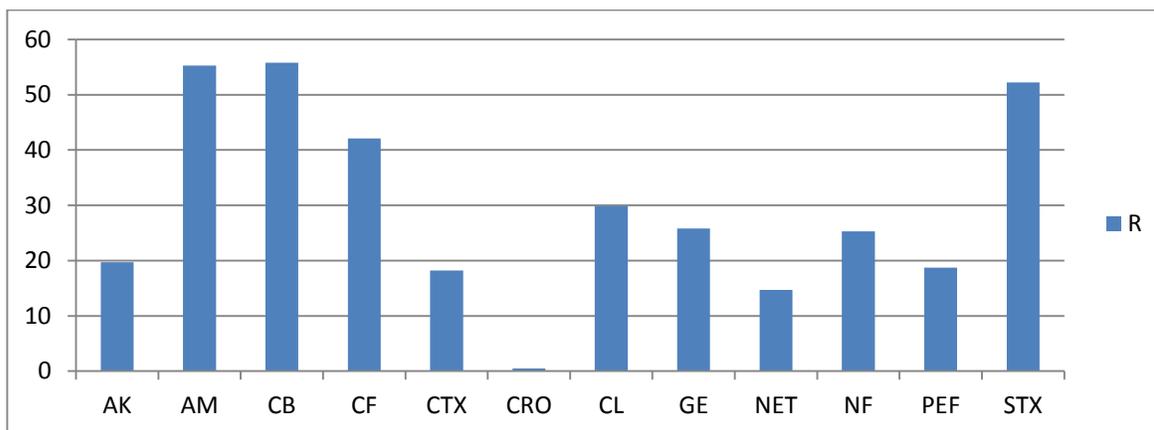
Antimicrobianos	AK	AM	CB	CF	CTX	CRO
Cepas resistentes (%)	19.7	55.3	55.8	42.1	18.2	0.5
Cepas intermedias (%)	6	8.6	13.7	28.9	8.6	19.7
Cepas sensibles (%)	74.1	36	30.4	28.9	73	79.6

Antimicrobianos	CL	GE	NET	NF	PEF	STX
Cepas resistentes (%)	29.9	25.8	14.7	25.3	18.7	52.2
Cepas intermedias (%)	7.6	3	4.5	18.2	11.6	4
Cepas sensibles (%)	62.4	71	80.7	56.3	69.5	43.6

(Fuente: Datos originales)

NOTA: AK, amikacina; AM, ampicilina; CB, carbenicilina; CF, cefalotina; CTX, cefotaxima; CRO, ceftriaxona; CL, cloranfenicol; GE, gentamicina; NET, netilmicina; NF, nitrofurantoína; PEF, pefloxacina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol.

Figura 2. Frecuencia de la resistencia de las cepas de *Escherichia coli* de aves de combate (n=197) mediante la prueba de difusión en agar en los municipios de Atlacomulco y El Oro



(Fuente: Datos originales).

NOTA: AK, amikacina; AM, ampicilina; CB, carbenicilina; CF, cefalotina; CTX, cefotaxima; CRO, ceftriaxona; CL, cloranfenicol; GE, gentamicina; NET, netilmicina; NF, nitrofurantoína; PEF, pefloxacina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol.

Las cepas obtenidas de aves de combate en el municipio de Atlacomulco presentaron una mayor resistencia a ampicilina con 60.7%, en orden descendente le sigue carbenicilina 60%, trimetoprim-sulfametoxazol 55.3%, cefalotina 53.8%, cloranfenicol 41.5%, nitrofurantoína 37.6%, gentamicina 36.9%, amikacina 30%, pefloxacina 28.4%, cefotaxima 27.6%, netilmicina 22.3% y para ceftriaxona 0.7% (Cuadro 10).

Prevalencia de la resistencia a antibióticos a través de la susceptibilidad de *Escherichia coli* en aves de combate en el norte del Estado de México

Cuadro 10. Patrón de sensibilidad *in vitro* de *Escherichia coli* de aves de combate (n=130) mediante la prueba de difusión en agar en el municipio de Atlacomulco.

Antimicrobianos	AK	AM	CB	CF	CTX	CRO
Cepas resistentes (%)	30	60.7	60	53.8	27.6	0.7
Cepas intermedias (%)	6.1	2.3	6.1	26.9	9.2	30
Cepas sensibles (%)	63.8	36.9	33.8	19.2	63	69.2

Antimicrobianos	CL	GE	NET	NF	PEF	STX
Cepas resistentes (%)	41.5	36.9	22.3	37.6	28.4	55.3
Cepas intermedias (%)	9.2	3.8	6.9	13.8	12.3	6.1
Cepas sensibles (%)	49.2	59.2	70.7	48.4	59.2	38.4

(Fuente: Datos originales).

Las cepas obtenidas de aves de combate en el municipio de El Oro presentaron una mayor resistencia a carbenicilina 47.7%, en orden descendente le sigue el trimetoprim-sulfametoxazol 46.2%, la ampicilina 44.7%, cefalotina 19.4%, cloranfenicol 7.4%, gentamicina 4.4%, nitrofurantoína 1.4%, en el caso de amikacina, pefloxacina, cefotaxima, netilmicina y ceftriaxona, las cepas aisladas no presentaron resistencia (Cuadro 11).

Cuadro 11. Patrón de susceptibilidad *in vitro* de *Escherichia coli* de aves de combate (n=67) mediante la prueba de difusión en agar en el municipio de El Oro.

Antimicrobianos	AK	AM	CB	CF	CTX	CRO
Cepas resistentes (%)	0	44.7	47.7	19.4	0	0
Cepas intermedias (%)	5.9	20.8	28.3	32.8	7.4	0
Cepas sensibles (%)	94	34.3	23.8	47.7	92.5	100

Prevalencia de la resistencia a antibióticos a través de la susceptibilidad de *Escherichia coli* en aves de combate en el norte del Estado de México

Antimicrobianos	CL	GE	NET	NF	PEF	STX
Cepas resistentes (%)	7.4	4.4	0	1.4	0	46.2
Cepas intermedias (%)	4.4	1.4	0	26.8	10.4	0
Cepas sensibles (%)	88	94	100	71.6	89.5	53.7

(Fuente: Datos originales).

NOTA: AK, amikacina; AM, ampicilina; CB, carbenicilina; CF, cefalotina; CTX, cefotaxima; CRO, ceftriaxona; CL, cloranfenicol; GE, gentamicina; NET, netilmicina; NF, nitrofurantoína; PEF, pefloxacina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol.

Se realizó un estudio comparativo entre la frecuencia de la resistencia de las cepas aisladas de *Escherichia coli* de aves de combate en los municipios de Atlacomulco y El Oro, en el caso de las aves analizadas en el municipio de Atlacomulco hay un claro predominio en la frecuencia de la resistencia a todos los antibióticos utilizados ($P < 0.05$). Como podemos ver en la siguiente tabla se pueden notar diferencias claras entre el porcentaje de resistencia, cuyos resultados se expresan a continuación (Cuadro 12).

Cuadro 12. Comparación de la frecuencia de la resistencia de las cepas de *Escherichia coli* de aves de combate mediante la prueba de difusión en agar en los municipios de Atlacomulco ($n=130$) y El Oro ($n=67$).

Clase o grupo de Antimicrobianos	Agente Antimicrobiano	Atlacomulco % de resistencia	El Oro % de resistencia
Aminoglucósido	Amikacina	30	0
β-lactámico	Ampicilina	60.7	44.7
β-lactámico	Carbenicilina	60	47.7
β-lactámico	Cefalotina	53.8	19.4
β-lactámico	Cefotaxima	27.6	0

Prevalencia de la resistencia a antibióticos a través de la susceptibilidad de *Escherichia coli* en aves de combate en el norte del Estado de México

β-lactámico	Ceftriaxona	0.7	0
Fenicol	Cloranfenicol	41.5	7.4
Aminoglucósido	Gentamicina	36.9	4.4
Aminoglucósido	Netilmicina	22.3	0
Nitrofurano	Nitrofurantoína	37.6	1.4
Fluoroquinolona	Pefloxacina	28.4	0
Diaminopirimidina-Sulfonamida	Trimetoprim-Sulfametoxazol	55.3	46.2
Promedio		37.9 ^a	14.2 ^b
P<0.05			

(Fuente: Datos originales).

En cuanto las galleras propiedad de socios que se encuentran afiliados a la Federación Mexicana de Criadores de Gallos de Pelea en los Municipios de Atlacomulco y El Oro, algunas de las cepas aisladas presentaron mayor resistencia a los antibióticos como fue a carbenicilina, ampicilina los cuales llegaron a presentar hasta el 100% de resistencia, mientras que cefalotina, cloranfenicol y gentamicina presentaron porcentajes muy variados desde 40 a 60 % de resistencia, para nitrofurantoína, amikacina, pefloxacina, cefotaxima, netilmicina la mayoría no superaba 30% y en el caso de ceftriaxona la mayoría de los aislamientos no representaron resistencia (Cuadro 13 y 14).

Prevalencia de la resistencia a antibióticos a través de la susceptibilidad de *Escherichia coli* en aves de combate en el norte del Estado de México

Cuadro 13. Porcentaje de aislamientos resistentes por socio en el municipio de Atlacomulco.

ANTIBIOTICO	SOCIO 1	SOCIO 2	SOCIO 3	SOCIO 4	SOCIO 5	SOCIO 6	SOCIO 7	SOCIO 8
Amikacina	28.5	27.2	21.4	41	9	23	0	33.3
Ampicilina	57.1	27.2	35.7	64.2	63.6	69.2	100	100
Carbenicilina	50	45.4	35.7	62.5	63.6	61.5	100	100
Cefalotina	50	36.3	57.1	62.5	45.4	46.1	60	33.3
Cefotaxima	28.5	18.1	21.4	35.7	9	23	20	33.3
Ceftriaxona	0	9	0	0	0	0	60	0
Cloranfenicol	35.7	36.3	21.4	41	45.4	46.1	60	83.8
Gentamicina	35.7	18.1	21.4	46.4	27.2	38.4	20	50
Netilmicina	21.4	18.2	21.4	25	18.1	23	0	33.3
Nitrofurantoína	42.8	18.1	21.4	48.2	27.2	30.7	20	50
Pefloxacina	28.5	45.4	14.2	35.7	9	15.3	20	33.3
Trimetoprim-Sulfametoxazol	57.1	72.7	35.7	53.5	63.6	46.1	80	66.6

(Fuente: Datos originales).

Cuadro 14. Porcentaje de aislamientos resistentes por socio en el municipio de El Oro.

ANTIBIOTICO	SOCIO 9	SOCIO 10	SOCIO 11	SOCIO 12	SOCIO 13	SOCIO 14
Amikacina	0	0	0	0	0	0
Ampicilina	12.5	20	58.3	37.5	71.4	60
Carbenicilina	12.5	20	66.6	62.5	71.4	50
Cefalotina	0	6.6	8.3	12.5	35.7	50
Cefotaxima	0	0	0	0	0	0
Ceftriaxona	0	0	0	0	0	0
Cloranfenicol	0	6.6	0	0	28.5	0
Gentamicina	0	20	0	0	0	0
Netilmicina	0	0	0	0	0	0

Prevalencia de la resistencia a antibióticos a través de la susceptibilidad de *Escherichia coli* en aves de combate en el norte del Estado de México

Nitrofurantoína	0	0	0	0	7.1	0
Pefloxacina	0	0	0	0	0	0
Trimetoprim-Sulfametoxazol	12.5	6.6	75	87.5	57.1	50

(Fuente: Datos originales).

Se consideraron como cepas multirresistentes aquellas que cumplieron con los siguientes criterios (Schwarz *et al.*, 2010):

- La resistencia a tres o más clases de agentes antimicrobianos se consideró como multirresistencia. Se debe tener cuidado con los subgrupos ya que su mecanismo de acción puede variar
- En el caso de los β -lactámicos se tomaron en cuenta los subgrupos ya que los mecanismos de resistencia pueden variar, por lo que se clasificaron de la siguiente manera:

Cuadro 15. Subgrupo de β -lactámicos que fueron empleados

β -lactámico	Subgrupo
Ampicilina	Aminobencilpenicilina
Carbenicilina	Carboxipenicilinas
Cefalotina	Cefalosporina de 1 ^a generación
Cefotaxima	Cefalosporinas de 3 ^r a generación
Ceftriaxona	

(Fuente: Datos originales).

En caso de que alguna cepa fuera resistente a la ampicilina, carbenicilina y cefalotina, entonces se considero como multirresistente (Cuadro 15).

En base a estos criterios se encontró que 54% de los 197 aislamientos eran multirresistentes.

De los aislamientos analizados en este estudio 22% no presentaron resistencia ante los 12 antimicrobianos empleados. Sin embargo, 13% de los aislamientos fueron resistentes a 1 antibiótico; 11% fueron resistentes a 2; 14% fueron resistentes a 3; 8% fueron resistentes a 4; 7% fueron resistentes a 5; 3% fueron resistentes a 6; 2% fueron resistentes a 7; 2% fueron resistentes a 8; 5.5% fueron resistentes a 9; 8% fueron resistentes a 10; 4% fueron resistentes a 11 y 0.5% de los aislamientos que fueron resistentes a 12 agentes quimioterapéuticos (cuadro 16).

Cuadro 16. Patrones de multirresistencia antimicrobiana de *E. coli*.^a

# de antibióticos que presentaron resistencia	Cepas (n= 197)	Porcentaje (%)
0	44	22%
1	26	13%
2	22	11%
3	28	14%
4	16	8%
5	13	7%
6	5	3%
7	4	2%
8	4	2%
9	11	5.5%
10	15	8%
11	8	4%
≥12	1	0.5%

(Fuente: Datos originales).

^a En este cuadro no se aplican los criterios de multirresistencia a fin de incluir todos los antibióticos y cepas.

XI.DISCUSIÓN

Escherichia coli causa enormes pérdidas económicas anuales en la industria avícola de todo el mundo. La resistencia a distintos tipos de antibióticos en cepas de *E. coli* se observa cada vez más, sobre todo en pollos de engorda y gallinas ponedoras, aunque queda mucho por conocer sobre la resistencia a los antibióticos en cepas de aves de combate, donde el uso de antibióticos es desconocido (Oosterik, *et al* 2014).

El uso de antibióticos en la producción de aves es un factor de riesgo que favorece la aparición de cepas resistentes de *E. coli* (Álvarez, *et al* 2013). En el presente estudio no se pudo determinar la cantidad exacta de antibióticos utilizados en este tipo de explotaciones, ya que en el país no se cuenta con un sistema que recolecte estos datos. No se obtuvo información suficiente de las galleras, ya que algunas de estas o la mayoría no llevan un registro sobre el uso de estos medicamentos, dificultando la estimación de la cantidad de antimicrobianos que se usan en campo. Se asume sin embargo, que el uso de antibióticos es alto, debido al fin zootécnico de estas aves, los cuales sugieren el uso de antimicrobianos sin contar con un previo diagnóstico en laboratorio, con el fin de evitar una rápida propagación de la enfermedad, ya que las instalaciones podrían permitir transmisiones por contacto directo, a través de fómites o de vectores o incluso el uso de antibióticos sin prescripción médica, debido a la falta de regulación en el manejo de estos productos. El uso de antibióticos fue mencionado por los criadores de aves de combate, excepto uno el cual menciono que no utilizaba antibióticos ya que cuando enfermaban las aves eran eliminadas de la parvada.

La prevalencia de microorganismos resistentes en animales tiene graves consecuencias, tanto para la salud animal como la salud humana ya que estas infecciones pueden ser de difícil manejo e incluso no responder al administrar antimicrobianos afectando la morbilidad y mortalidad de ambas poblaciones (Cabrera, *et al* 2007). En las personas, estos patógenos pueden necesitar

tratamientos más largos, incrementándose así el número de personas infectadas en los hospitales, o aumentando su estancia en el hospital, y elevando los costos del tratamiento cuando las bacterias se hacen resistentes a los agentes de primera línea, por lo que se requerirán antimicrobianos más costosos o incluso más tóxicos (Mosquito, *et al* 2011). En cuanto al sector agropecuario, este problema puede generar tratamientos más costosos, así como la mortalidad en un gran número de animales; a esto se suma la pérdida económica que representa para los productores (Boulianne., *et al* 2016).

Se observó que para la mayoría de los antibióticos hubo una resistencia en las aves muestreadas en los dos municipios (Atlacomulco y El Oro) a excepción de la ceftriaxona. La prevalencia de la resistencia a la ampicilina (55%), el trimetoprim-sulfametoxazol (52%), gentamicina (25%) y ceftriaxona (.5%); siendo significativamente mayor en aves de combate que en pollos de engorda y gallinas ponedoras, pollos criados de manera convencional, orgánica, kosher y aves criadas sin antibióticos que es una forma de cría parecida a la de aves de combate la cual no es de forma intensiva; para ampicilina (31%), trimetoprim-sulfametoxazol (3%), gentamicina (10%) y ceftriaxona (0%) (Millman *et al.*, 2013).

La resistencia a la sulfonamida fue uno de los perfiles de resistencia más comunes identificados en este estudio con un 52%, se ha demostrado una tendencia monótona creciente de la resistencia a lo largo del tiempo. Resistencia a las sulfonamidas se ha observado en *E. coli* aislada de humano (19%) y en animales (52%) desde 1936 (Tadesse *et al.*, 2012). Las sulfonamidas se introdujeron en la década de 1930 y han estado en uso continuo por más 70 años (Alekhun y Levy, 2007). Estos fármacos se administraron solos desde 1930 hasta 1960 en los seres humanos y se combinaron casi exclusivamente con diaminopirimidinas (por ejemplo, trimetoprim) desde la década de 1970 (Davies y Davies, 2010). En los sistemas de producción animal, la sulfonamida es uno de los medicamentos más comúnmente utilizado como agente único o en combinación con

diaminopirimidinas (por ejemplo, trimetoprim). Una prevalencia de 30% de resistencia clínica a las sulfonamidas se informó en bacterias entéricas aisladas de animales sanos, alimentos y seres humanos (y con frecuencia se asocia con la adquisición de la genes de resistencia sul1 y sul2) (Lanz, *et al* 2003).

Los genes de resistencia a sulfonamida son comúnmente asociados con elementos genéticos móviles, y estos elementos juegan un papel importante en la difusión de múltiples genes de resistencia a fármacos antimicrobianos en aislamientos de *E. coli* (Zhu, *et al* 2013). Además, a pesar de una importante reducción de la tasa de uso de sulfonamida en el Reino Unido en 1995, la resistencia a las sulfonamidas persistió en porcentajes altos de una clínica en aislados de *E. coli*. Del mismo modo, un estudio de seguimiento sobre la resistencia a los medicamentos antimicrobianos en el Hospital Karolinska de Estocolmo, Suecia 30 años (1979-2009), informó de un aumento de la resistencia a las sulfonamidas a pesar de la disminución del uso (Liderot, *et al* 2016). En este estudio los análisis de sensibilidad realizados a las cepas de *E. coli* se obtuvieron resultados de resistencia a sulfamidas superior a 50% en aves de combate.

La unión de genes de resistencia a sulfonamidas, en particular como componente de integrones de clase I, con los factores determinantes que confieren resistencia a los antimicrobianos que todavía son comúnmente utilizados podría ayudar a explicar la persistencia de la resistencia a las sulfamidas (Su, *et al* 2012).

En este estudio un 30% de *E. coli* mostró resistencia a cloranfenicol, un fármaco aprobado en 1947 para el uso clínico en humanos (Davies y Davies, 2010). El cloranfenicol no está aprobado para su uso en animales en los Estados Unidos. Florfenicol, es un fármaco estrechamente relacionado con cloranfenicol, fue aprobado para el tratamiento de enfermedades respiratorias en el ganado en los Estados Unidos en 1996 (Thiry, *et al* 2014).

La gentamicina fue aprobada para su uso en 1963. Aunque la resistencia a la gentamicina era rara en *E. coli* aislada de humanos, se encontró que tasas de resistencia fueron <20% en *E. coli* de animales en 2002 (San Martín, *et al* 2002). Desde 1980, la resistencia a la gentamicina ha aumentado entre los aislados de *E. coli* en animales además de presentarse multirresistencia en estudios realizados en caballos de 75% de los casos se aisló *E. coli* resistente a gentamicina, ácido nalidixico y a ciprofloxacina (Morales, *et al* 2014). En este estudio se demostró que el patrón de resistencia a gentamicina fue mayor en Atlacomulco siendo superior al 25%.

Un informe reciente se demostró que la resistencia a la ceftriaxona varió de 1% a 2% entre los aislados de productos de pollos durante 2014 (López, *et al* 2014). En las cepas de *E. coli* aisladas de aves de combate en este estudio, el porcentaje de resistencia fue del 0.5%. Actualmente, se están investigando los mecanismos moleculares del desarrollo de resistencia a fármacos antimicrobianos y la evolución de estos genes de resistencia a lo largo del tiempo.

A pesar de estas limitaciones, este análisis proporciona información fundamental para el conocimiento de la resistencia a lo largo del tiempo, sentando las bases para la comprensión de la evolución de la resistencia a múltiples fármacos a nivel genético de importancia en medicina veterinaria (Sánchez, *et al* 2014). Además, estos datos muestran que la resistencia a múltiples fármacos no es una característica congénita de *E. coli*, y que el uso de drogas y la resistencia están estrechamente relacionados temporalmente. Se está trabajando para analizar estas cepas, para identificar y aislar genes de resistencia y compararlos con los aislados recientes de otros trabajos. Este trabajo proporcionará más datos definitivos sobre cómo grupos de genes de resistencia han evolucionado (Gholami y Zia, 2014).

Existen varios estudios que afirman que estas bacterias resistentes en aves pueden pasar a personas por contacto directo, así se ha detectado que la resistencia puede adquirirse por la transmisión de genes de resistencia a antibióticos, de esta manera se han encontrado los mismos genes de resistencia en bacterias aisladas de aves y humanos (Van den Bogaard, *et al* 2014). Otros estudios sugieren que varias de estas cepas resistentes a los fármacos en humanos son adquiridas por las aves cuando estas ya son resistentes, de esta manera un mayor consumo o contacto con estas bacterias resistentes puede aumentar las posibilidades de adquirir los genes de resistencia o la bacteria resistente a antimicrobianos (Mayrhofer, *et al* 2004).

Este es el primer estudio realizado en México con respecto a los patrones de resistencia a los antimicrobianos en aves de combate y que es de importancia para los MVZ y salud pública en México. La información recogida en el presente estudio es un primer paso necesario hacia la implementación de un programa para la vigilancia de la resistencia y uso adecuado de los antimicrobianos en la medicina veterinaria en México.

XII.CONCLUSIONES

Existe una alta resistencia antimicrobiana en los aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos de aves de combate en el norte del Estado de México.

La mayor resistencia encontrada de *Escherichia coli* aislada de aves de combate del Estado de México fue para carbenicilina y ampicilina, la menor resistencia fue para ceftriaxona.

Las cepas de *Escherichia coli* que obtuvieron la mayor resistencia a los antibióticos se presentaron en los criaderos de Atlacomulco.

Los resultados encontrados en esta investigación, alertan a la población a nivel nacional sobre el incremento paulatino de la resistencia de las bacterias a los diferentes antimicrobianos utilizado en animales.

XIII.SUGERENCIAS

Continuar realizando estudios para valorar la resistencia de *Escherichia coli* a antibióticos en aves de combate en diferentes municipios del Estado de México.

Realizar estudios moleculares para determinar patrones genéticos de resistencia

Se recomienda un buen empleo de los antibióticos a las dosis adecuadas y con la asesoría de un médico veterinario, se sugiere la rotación y combinación de los diferentes grupos de antibióticos, para prevenir la resistencia a antibióticos en aves.

Continuar realizando estudios de vigilancia epidemiológica para conocer el comportamiento de la resistencia a los antibióticos.

Se deben realizar otras investigaciones a nivel nacional que ayuden a definir la situación actual de efectividad de los diferentes antimicrobianos utilizados en el área veterinaria.

Establecer las políticas para el uso racional y controlado de las diversas drogas utilizadas en la producción de animales.

XIV.LITERATURA CITADA

Aguilar MS. (2011): Sensibilidad *In vitro* de cepas de *Escherichia coli* hemolítica aisladas de canales de bovinos en el Estado de México. Tesis de licenciatura , FMVZ, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México.

Alekshun MN, Levy SB. (2007): Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128(6):1037-1050.

Álvarez FE, Cancelo A., D VC, Capita R, Alonso CC. (2013): Antimicrobial resistance in *E. coli* isolates from conventionally and organically reared poultry: A comparison of agar disc diffusion and Sensi Test Gram-negative methods. *Food Control*, 30(1):227-234.

Archer G. Polk R. (2006): Tratamiento y profilaxis de las Infecciones Bacterianas. En: Kasper D., Fauci A., Longo D., Braunwald E., Hauser S., Jameson J. Harrison Principios de Medicina Interna. 16ª ed., McGraw-Hill Interamericana, México.

Barnes HJ, Gross WB, (1997): "Colibacillosis". *Diseases of poultry*, 9 edition. Iowa State Univ Press, Ames, EE. UU.

Barnes HJ, Vaillancourt JP, Gross WB. (2003): "Colibacillosis" *Diseases of Poultry*, 11th Edition, Section II, Chapter 18.

Becerra G, Plascencia A, Luévanos A, Domínguez M, Hernández I. (2009): Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias. *Enf Inf Microbiol*, 29(2):70-76.

Benz I, MA Schmidt. (1992): Isolation and serologic characterization of AIDA-I, the adhesin mediating the diffuse adherence phenotype of the diarrhea associated *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27). *Infect Immun* 60:13-18.

Blanco M, Blanco JE, Mora A, Blanco J. (1996): "*Escherichia coli* septicémicos aviares: serotipos, factores de virulencia, resistencia a antibióticos y desarrollo de vacunas" Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela (LUGO). *Medicina Veterinaria*, 13:179-180.

Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Mora A, Alonso MP, González EA, Bernárdez MI. (2002): "Enterobacterias: características generales. Género *Escherichia*" Manual de Microbiología Veterinaria, S. Vadillo, S. Píriz and E. Mateos, 21: 301-325.

Boop CA, Brenner FW, Wells JG, Strockbine N. *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella* (1999): En: Manual of clinical microbiology. Murray PR, E Jo Baron, MA Pfaller, FC Tenover, RH Tenover, RH Tenover, RH Tenover. 7th ed Washington, D.C. E d. ASM. Press.: 459-474.

Boulianne M, Arsenault J, Daignault D, Archambault M, Letellier A, Dutil L. (2016): Drug use and antimicrobial resistance among *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. isolates from chicken and turkey flocks slaughtered in Quebec, Canada. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 80(1):49-59.

Brito KCT., Jaenisch FRF., Oivera GA., Soares BD, Brito BG. (2011): Resistencia antimicrobiana y patogenicidad de muestras de *Escherichia coli* aisladas de lesiones de celulitis en pollos. XXII Congreso Latinoamericano de Avicultura 2011., Buenos Aires, Argentina, 1-3.

Cabrera EC, Gómez RF. Zúñiga EA. (2007): La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación, *Colombia Médica*, 38(2).

Cabrera S. (2009): Uso racional y responsable de antimicrobianos, Facultad de Medicina. U de la R. Montevideo *Arch Med Interna*, 2(3):74-803.

Calderwood S, Moellering DJr. (1988): Principios de tratamiento anti infeccioso. En: Stein LH. Medicina interna. 2 ed. La Habana: Editorial Científico-Técnica, 1469(86).

Calvo J, Martínez-Martínez L. (2009): Mecanismos de acción de los antimicrobianos. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, 27(1):44-52.

Carlioni G, Pereyra A, Denamiel G, Gentilini E. (2011): Resistencia a antimicrobianos en aislamientos de *Escherichia coli* de origen animal. InVet, 13(2):47-51.

Cassels FJ, Wolf MK. (1995): Colonization factors of diarrheagenic *E. coli* and their intestinal receptors. J Ind Microbiol., 15:214-226.

Cavaliere S. (2005): Mecanismos de acción de fármacos. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. American Society for Microbiology. Canadá.

Clavell L, Pedrique de Aulacio M. (1992): Microbiología. Manual de Métodos Generales. Segunda edición. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela, Venezuela.

Cravioto A, Vázquez V, Soria A, Navarro A, Ortiz M. (1998). Producción de citotoxina tipo shiga (SLT)1 en cepas de *Escherichia coli* aisladas de niños con diarrea en una comunidad rural. Bol Med Hosp Infant Mex. 45: 206-210.

Czeczulin JR, Balepur S, Hicks S, Philips A, Hall R, Kothary MH *et al.* (1997): Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect Immun. 65:4135-4145.

Davies J, Davies D. (2010): Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 74(3): 417-433.

Daza PRM. (1998): Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria, Hospital Universitario Clínica Puerta de Hierro. Madrid, Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud, 22(3).

Dho-Moulin D, Répérant M, Laurent S, Brée A, Mignon S, Germon P, Rasschaert D, Schouler C. (2007): "Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns" *Journal of Clinical Microbiology*, 45(10):3366-3376.

Donnenberg MS, Girón JA, Kaper JB. (1992): A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. *Mol Microbiol.*, 6:3427-3437.

Eslava C. (2000): Pet toxin from enteroaggregative *Escherichia coli* produces cellular damage associated with fodrin disruption. *Infect and Immun.*, 68:5920-5927.

Eslava C, Navarro-García F, Czeczulin JR, Henderson IR, Cravioto A, Nataro JP. (1998): Pet an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 66:3155-3163.

Eslava C, Mateo J, Cravioto (1994): A. Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea. En: diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Giono S, Escobar A, Valdespino JL. Secretaría de Salud. México, 251.

Ewing WH. (1985): *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae*. 4th. Edition, Elsevier.

Ewers C, Janben T, Kiebling S, Philipp HC, Wieler LH. (2004): "Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia en poultry" *Veterinary Microbiology.*, 104:91-101.

Franzolin, MR, Alves RCB, Keller R, Gomes TAT, Beutin L, Barreto ML, Trabulsi L R. (2005): Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 100(4), 359-363.

Gholami AM, Zia JN. (2014): Identification of Shiga toxin and intimin genes in *Escherichia coli* detected from canary (*Serinus canaria domestica*). Toxicology and industrial health, 30(8):724-727.

González RG, Mella MS, Zemelman ZR, Bello TH, Domínguez YM. (2004): Integrons and resistance gene cassettes: structure and role against antimicrobials. Rev Méd Chile, 132:619-626.

Groos, M, Perelli A, Alvarado R, Arias Y, Blumenthal E. (2012): Actividad bacteriostática y bactericida de la tintura de propóleos sobre bacterias enteropatógenas. Salus., 16:21-25.

Gross WB, Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WM Yoder HW. (1991): "Colibacillosis" Diseases of poultry, 9 ed. Ames: Iowa States University Press., 138-144.

Guerrero ZRJ. (2007): La importancia económica de los gallos de pelea, memorias del Tercer Congreso Internacional y Cuarto Congreso Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia en Gallos de Pelea, Aguascalientes, Aguascalientes, 1-4.

Halet T, Sansonetti P, Schad P, Austin S, Formal SB. (1983): Characterization of virulence plasmids and plasmid associated outer membrane proteins in *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* and *Escherichia coli*. Infect Immun., 40:340-350.

INEGI (2010): Banco de Información INEGI, México. <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/biinegi/default.aspx> (Fecha de consulta 10 de junio de 2016).

Jaramillo ACJ, Martínez MJJ. (2009). Epidemiología veterinaria. Editorial El Manual Moderno. México.

Jawetz E., (1989) Quimioterapia antimicrobiana. En Manual de microbiología médica. 9ed., Editorial El Manual Moderno, SA de CU, México.

Kariyawasam S, Wilkie BN, Hunter DB, Gyles CL. (2002): "Systemic and mucosal antibody responses to selected cell surface antigens of avian pathogenic *Escherichia coli* in experimentally infected chickens" Avian Diseases., 46:668-678.

Landman WJ, Cornelissen RA. (2006): "*Escherichia coli* salpingitis and peritonitis in layer chickens: an overview" Tijdschr Diergeneeskd, 131(22):814-22.

Lanz R, Kuhnert, P, Boerlin P. (2003): Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. Veterinary microbiology, 91(1):73-84.

Liderot K, Ratcliffe P, Lüthje P, Thidholm E, Özenci V. (2016): Microbiological diagnosis of *Eggerthella lenta* blood culture isolates in a Swedish tertiary hospital: Rapid identification and antimicrobial susceptibility profile. Anaerobe, 38: 21-24.

López, A, Ruiz AC, Cabrera C, León G, Tejeda F. (2014): Prevalencia de cepas multirresistentes de *Salmonella spp* y *Escherichia coli* 0157: H7 en alimentos crudos en la Ciudad de Puebla. Congreso Interdisciplinario de Cuerpos Académicos, Puebla, México, 209-222.

Machota SV, Duran SP y Yanes EMM. (2002): Manual de microbiología veterinaria. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, España.

Maheux AF, Picard FJ, Boissinot M, Bissonnette L, Paradis S, Bergeron MG. (2009): Analytical comparison of nine PCR primer sets designed to detect the presence of *Escherichia coli/Shigella* in water samples. Water research, 43(12):3019-3028.

Matute GWI. (2008): Antimicrobianos. Universidad Nacional Autónoma de Honduras, Rev. Fac. Cienc. Méd. Honduras.

Mayrhofer S, Paulsen P, Smulders FJ, Hilbert F. (2004): Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry. International journal of food microbiology, 97(1):23-29.

Millman JM, Waits K, Grande H, Marks AR, Marks JC, Price LB, Hungate BA. (2013): Prevalence of antibiotic-resistant *E. coli* in retail chicken: comparing conventional, organic, kosher, and raised without antibiotics. 2:155

Mollinedo G, Augusto C, Valenzuela MCL, Mérida ACM. (2014): Identificación de perfiles de ácidos grasos de cepas nativas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* utilizando la técnica de cromatografía de gases. Tesis Doctoral, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

Monroy MA, Knöbl T, Bottino JA, Ferreira CSA, Ferreira AJP. (2005): *Escherichia coli* isolates obtained from broiler breeders with salpingitis” Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases., 28:1-15.

Morales A., García F, Morales MR., Leal L., López P. (2014) Resistencia a aminoglicosidos y quinolonas en un equino con esofagitis reporte de un caso/Aminoglycosides and quinolones resistance in a equine with oesophagitis report of case. Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica, 33(3):84.

Mosquito S, Ruiz J, Bauer JL, Ochoa TJ. (2011): Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. Rev Peru Med Exp Salud Pública, 28(4):648-56.

Nataro JP, Deng Y, Maneval DR, German AL, Martin WC, Leviene MM. (1992): Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate

adherence to Hep-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infect Immun.*, 60:2297-2304.

Nataro JP, Kapper JB. (1998): Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.*, 11:142-201.

Navarro RF, Cardona ME, Otero MB. (2002): Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 20(5):225-234.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (2006) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 9th ed, vol 26, no 1. Approved Standards M2-A9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

Neidhardt FC. (1999): *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular Biology. 2nd edition. ASM Press, Washington.

Neu H. (1987): Conceptos generales sobre quimioterapia de enfermedades infecciosas. *Clin Med North Am.*, 71:1115.

Noriega RLM. (2004): ¿En qué ayuda el antibiograma al médico clínico en la atención de sus pacientes?, Facultad de Medicina Clínica Alemana. Universidad del Desarrollo. Santiago, Chile, *Rev Chil Infect.*, 21(1):34-38.

O'Brien A, LaVeck GD, Thompson MR, Formal SB. (1982): Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis.*, 146:763-769.

Ornelas, R.M. (2007): Fases de Alimentación en el Gallo de Pelea y sus puntos críticos. Memorias del Tercer Congreso Internacional y Cuarto Congreso Nacional de medicina Veterinaria y Zootecnia en Gallos de Pelea, Aguascalientes, Aguascalientes, 114-116.

OMS (2015): Resistencia a los antibióticos, Ginebra. <http://www.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/> (Fecha de consulta 10 de junio de 2016).

OMS (2017): La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos, Ginebra. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/> (Fecha de consulta 14 de noviembre de 2017).

Oosterik LH, Peeters L, Mutuku I, Goddeeris BM, Butaye, P. (2014): Susceptibility of avian pathogenic *Escherichia coli* from laying hens in Belgium to antibiotics and disinfectants and integron prevalence. *Avian diseases*, 58(2): 271-278.

Palavecino RE. (1997): Boletín Escuela de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile., 26:156-160.

Pérez ZE. (1999): Su majestad El gallo de pelea. 2da ed., Edinova, México.

Pineda LE, Talavera RM, Peña RAH, Soriano VE, Alejandri CC. (2015): Perfiles hematológicos en respuesta a la administración de inmunomoduladores inespecíficos en aves de combate (*Gallus gallus gallus*). *Revista Científica*, 25(005).

Rico-Martínez MG. (1995): Biología molecular en la patogenia de *Shigella sp* y *Escherichia coli* enteroinvasiva. *Rev Latinoam Microbiol.*, 37:367-385.

Rincón JR, Llanos RL, Gómez JG. (2000). Los aminoglucósidos en la nueva década: su uso en la clínica práctica. *Rev Esp Quimioter.*, 13:352:363.

Riveros M, Barletta F, Cabello M, Durant D, Mercado EH, Contreras C, Rivera FP, Mosquitos S, Lluque A, Ochoa TJ. (2011): Patrones de adherencia de cepas de *Echerichia coli* difusamente adherente (DAEC) Provenientes de niños con y sin diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.*, 28(1):21-28.

Rodríguez-Ángeles G. (2002): Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública de México, 44(5):464-475.

Rodríguez GJA, Cantón R, Sánchez GJE, Lus GM L, Martínez ML, Avial RC, Vila J. (2000): Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos, Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. España.

Russeld ID. (1992): Proper water medication with good water systems. PoultryDigest., 5:40-48.

Sánchez MDP, Gutiérrez NP, Padilla MY, Suárez L.L. (2015): Antimicrobial resistance of bacteria isolated from veterinary clinics in the city of Ibagué, Colombia. Universidad y Salud, 17(1):18-31.

Sande M, Mandell GL. (1982): Quimioterapia de las enfermedades: agentes antimicrobianos. En: Goodman Gilman A, Goodman LS. Las bases farmacológicas de la terapéutica. La Habana:Editorial Científico- Técnica., 2:1062-1165.

San Martín B, Kruze J, Morales MA, Agüero H, León B, Espinoza S, Borie C. (2002) Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y Xª Región, Chile. Archivos de medicina veterinaria, 34(2):221-234.

Schmidt H, Beutin L, Karch H. (1995): Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain 933. Infect Immun., 63:1055-1063.

Schwarz S, Silley P, Simjee S, Woodford N, van Duijkeren E, Johnson AP y Gaastra W. (2011): Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *J Antimicrob Chemother.*, 65(4): 601-604.

Sears CL, Kapper JB. (1996): Enteric bacterial toxins: Mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. Microbiol Revs., 60:167-215.

Sethabutr O, Venkatesan M, Yam-Pang LW, Smoak BL, Sang WK *et al.* (2000): Detection of PCR products of the ipaH gene from *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by enzyme linked immunosorbent assay. *Diagn. Microbiol Infect Dis.*, 37:11-16.

Su HC, Ying GG, Tao R., Zhang RQ, Zhao JL., Liu YS. (2012): Class 1 and 2 integrons, sul resistance genes and antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from Dongjiang River, South China. *Environmental Pollution*, 169:42-49.

Sumano LH. (1993): Quinolonas y Fluoroquinolonas en medicina veterinaria. *Vet. Méx.*, 24:1-15.

Sumano LH, Gutiérrez OL. (2000): Problemática del uso de la enrofloxacin en la avicultura en México. *Veterinaria México*. 31(2):137-145

Sumano LH, Negron G, Fernández G. (2000): Consideraciones prácticas y farmacológicas para medicación de antibacterianos en avicultura. *Revista Científica. Fac. de Ciencias Vet. Universidad de Zulia.*, 3:251-266.

Tadesse DA, Zhao S, Tong E, Ayers S, Singh A, Bartholomew MJ, McDermott PF. (2012): Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950–2002. *Emerging Infectious Diseases*. 18:5.

Talavera RM. (2009): Enfermedad de Marek, Memorias del Quinto Congreso Internacional y Sexto Congreso Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia en Gallos de Pelea, Celaya, Guanajuato.

Thiry J, González JV, Elvira L, Pagot E, Voisin F, Lequeux G, de Haas V. (2014): Treatment of naturally occurring bovine respiratory disease in juvenile calves with a single administration of a florfenicol plus flunixin meglumine formulation. *Veterinary Record*, 174(430):430.

Van de Kerchove D, De Herdt P, Laevens H, Pasmans F. (2004): "Colibacillosis in caged layer hens: characteristics of the disease and the a etiological agent" *Avian Pathology.*, 33(2):117-125.

Van den Bogaard AE, London N, Driessen C, Stobberingh, EE. (2001): Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(6):763-771.

Van der Broek P. (1989): Antimicrobial drugs, microorganism and phagocytes. *Rev Infect Dis* 2:213-8.

Vargas J, Máttar S, Monsalve S. (2010): Bacterias patógenas con alta resistencia a antibióticos: estudio sobre reservorios bacterianos en animales cautivos en el zoológico de Barranquilla, Asociación Colombiana de Infectología *Revista Infectio.*, 14(1):6-19

Villaseca JM, Navarro-García F, Mendoza-Hernández G, Nataro JP, Cravioto A, Eslava C. (2000): Pet toxin from enteroaggregative *Escherichia coli* produces cellular damage associated with fodrin disruption. *Infection and immunity*, 68(10): 5920-5927.

Wages DP. (1997): Proper medication procedures. *Poultry Digest*. 56: 18-19.

Zhu YG, Johnson TA, Su JQ, Qiao M, Guo GX, Stedtfeld RD, Tiedje JM. (2013): Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(9):3435-3440.