



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Klebsiella spp* AISLADAS EN LA CADENA DE PRODUCCIÓN DE FRESA EN CULIACÁN, SINALOA

Por:

Angel Ibarra Rodríguez

TESIS APROBADA POR LA

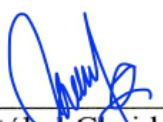
COORDINACIÓN CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA PRODUCTOS AGRÍCOLAS DE
ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis del C. Angel Ibarra Rodríguez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz
Director de tesis

JOSE A. MEDRANO

Dr. José Andrés Medrano Félix
Integrante de comité de tesis



Dra. Nohelia Castro Del Campo
Integrante de comité de tesis

LÓPEZ CUEVAS OSVALDO

Dr. Osvaldo López Cuevas
Integrante de comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Caracterización Genómica de Cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp Aisladas en la Cadena de Producción de Fresa en Culiacán, Sinaloa” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Angel Ibarra Rodríguez, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos


Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante dos años, para la realización de mis estudios de maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) coordinación Culiacán, por permitirme utilizar sus instalaciones para poder llevar a cabo mis estudios durante estos años.

Al Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria (LANIA) por el apoyo técnico-científico brindado para llevar a cabo el cumplimiento del proyecto de investigación.

Al Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz con un gran aprecio, respeto y admiración por fungir como director de tesis y brindarme la oportunidad de formar parte de un gran equipo de trabajo, por sus consejos y enseñanzas los cuales llevaré conmigo el resto de mi vida profesional.

Al Dr. Osvaldo López Cuevas por sus consejos y opiniones, por compartir sus conocimientos y experiencia, por siempre tener la mejor disposición de apoyar en todos los aspectos.

A la Dra. Nohelia Castro del Campo por su apoyo como parte de mi comité de tesis, sus comentarios y observaciones para la realización de este proyecto.

Al Dr. José Andrés Medrano Félix por sus observaciones, por compartir sus conocimientos y su experiencia y por su disponibilidad para compartir información y realizar comentarios pertinentes que permitieron mejorar y llevar a cabo el presente proyecto de investigación.

A los Investigadores que fueron mis maestros durante estos dos años, por compartir sus conocimientos y contribuir en mi formación académica y profesional.

A la QFB Célida Isabel Martínez Rodríguez y Miriam Belem Rodríguez por sus consejos y apoyo técnico en el laboratorio y asesoría durante los ensayos y por facilitar los materiales necesarios.

Al M.C. Jean Pierre Gonzáles Gómez por sus consejos y su asesoría en los ensayos de laboratorio y por compartir sus conocimientos en el área bioinformática, los cuales fueron de gran apoyo para reforzar y llevar a cabo el presente trabajo de investigación, por la motivación a culminar este proyecto y por la amistad.

A mis compañeros de Maestría Manuel Angel, Hilary, Yazmín, Estefanía por su amistad y apoyo durante esta etapa.

A todas las personas que de alguna manera u otra contribuyeron para poder culminar esta investigación.

DEDICATORIA

A mis padres y a mi hermano por estar siempre presentes, son mi motivo para seguir adelante y cumplir mis metas y objetivos, por todo su apoyo, comprensión y consejos que siempre llevo conmigo, y por nunca dejarme solo.

A todas las personas que creyeron en mí, y de alguna manera me apoyaron.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
CONTENIDO	6
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE CUADROS	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	13
2. ANTECEDENTES	16
2.1. Agentes Causales de Gastroenteritis	16
2.2. Patógenos Entéricos.....	18
2.2.1. <i>Escherichia coli</i>	18
2.2.1.1 Patotipos de <i>E. coli</i>	19
2.2.1.2 <i>E. coli</i> enteropatógena.....	19
2.2.1.3 <i>E. coli</i> productora de toxina Shiga (STEC).....	19
2.2.1.4 <i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC).....	20
2.2.1.5 <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC)	20
2.2.1.6 <i>E. coli</i> de adherencia difusa (DAEC).....	20
2.2.1.7 <i>E. coli</i> adherente-invasiva (AIEC).....	21
2.2.1.8 <i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC).	21
2.2.2. <i>Klebsiella</i>	23
2.2.2.1. Sideróforos adquiridos en cepas de <i>Klebsiella</i>	24
2.2.2.2. Colibactina en cepas de <i>Klebsiella</i>	24
2.2.2.3. Hipermucoviscosidad en cepas de <i>Klebsiella</i>	24
2.3. Resistencia a Antibióticos	25
2.4. Fuentes de Contaminación de Productos Frescos.....	28
2.5. Sistema de Reducción de Riesgos de Contaminantes	30
2.6. Producción de Frutillas.....	32
2.6.1. Producción de Fresa.....	32
2.6.2. Descripción de la Zona de Estudio	33
2.6.3. Calidad Microbiológica de la Fresa.....	35
2.7. Caracterización Genotípica de Enterobacterias.....	36
3. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN	39
4. OBJETIVOS	40
4.1. Objetivo General.....	40
4.2. Objetivos Específicos	40

CONTENIDO (continuación)

5. MATERIALES Y MÉTODOS	41
5.1. Toma de Muestras	41
5.2.. Cuantificación de Coliformes Totales, Fecales y <i>E. coli</i>	42
5.3. Prueba fenotípica de Susceptibilidad a Antibióticos	43
5.4. Secuenciación, Ensamble y Anotación de Genomas de Aislados en la Producción de Fresa	44
5.4.1. Caracterización de Genes de Resistencia a Antibióticos y Genes de Virulencia	45
5.5. Determinación del Pangenoma y Análisis Filogenómico de Cepas de <i>E. coli</i> y <i>Klebsiella</i>	46
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
6.1. Cuantificación de Coliformes Totales, Fecales y <i>E. coli</i>	47
6.1.1. Agua de Irrigación	48
6.1.2. Fruto Precosecha.....	48
6.1.3. Superficie de Recipientes.....	49
6.1.4. Manos Durante la Cosecha	49
6.1.5. Fruto en Punto de Venta	50
6.2. Prueba fenotípica de Susceptibilidad a Antibióticos	51
6.3. Secuenciación, Ensamble y Anotación de Genomas.....	53
6.3.1. Anotación del Genoma de <i>E. coli</i> A3a	54
6.3.2. Anotación Del Genoma de <i>E. coli</i> A4b	56
6.3.3. Anotación del Genoma de <i>E. coli</i> S4b.....	58
6.3.4. Anotación del Genoma de <i>Klebsiella pneumoniae</i> M4g	60
6.3.5. Anotación del Genoma de <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> Fv4a.....	62
6.3. Perfil de Plásmidos	63
6.4. Predicción de Patogenicidad de los Aislados Secuenciados	65
6.5. Genes de Resistencia a Antibióticos.....	65
6.6. Análisis Filogenético y de Pangenoma de Cepas de <i>E. coli</i> y <i>Klebsiella</i>	68
7. CONCLUSIONES	76
8. RECOMENDACIONES	77
9. REFERENCIAS	78

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pagina
1. Adhesión de los diferentes patotipos de <i>E.coli</i>	22
2. Características genéticas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> hipervirulenta.....	25
3. Mecanismos de resistencia a antibióticos en enterobacterias.....	27
4. Mapa de monitoreo de la calidad del agua (coliformes fecales) en Sinaloa durante 2017.....	30
5. Posición taxonómica de <i>K. pneumoniae</i>	38
6. Ubicación del plantío donde se realizó la toma de muestra.....	34
7. Genoma anotado de <i>E. coli</i> A3a con el servidor PATRICBRC.....	55
8. Genoma anotado de <i>E. coli</i> A4b con el servidor PATRICBRC.....	58
9. Genoma anotado de <i>E. coli</i> S4b con el servidor PATRICBRC.....	59
10. Genoma de <i>Klebsiella pneumoniae</i> st. M4g anotado con el servidor PATRICBRC.....	61
11. Genoma anotado de <i>K. quasipneumoniae</i> Fv4a con el servidor PATRICBRC.....	65
12. Ruta de resistencia a betalactámicos.....	68
13. Pangenoma de <i>E.coli</i>	71
14.Árbol filogenético de genomas de <i>E. coli</i>	72
15. Pangenoma de <i>Klebsiella</i>	74
16. Árbol filogenético de genomas de <i>Klebsiella</i>	75

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Antibióticos utilizados para la evaluación de resistencia en enterobacterias.	43
2 Concentraciones de bacterias Coliformes totales y Coliformes fecales obtenidas en los diferentes tipos de muestra.	47
3 Resultados de prueba de resistencia a antibioticos por el metodo de Kirby-Bauer.....	52
4 Resultados del ensamble de las secuencias de los aislados utilizando SPAdes v3.0	53
5 Datos obtenidos de anotación del genoma utilizando PATRICBCR sobre las características genómicas de <i>E. coli</i> y <i>Klebsiella</i>	54
6 Contenido de factores de virulencia y genes de resistencia a antibióticos en <i>E. coli</i> A3a	55
7 Contenido de factores de virulencia y genes de resistencia a antibióticos en <i>E. coli</i> A4b.....	58
8 Contenido de factores de virulencia y genes de resistencia a antibióticos en <i>E. coli</i> S4b	60
9 Contenido de factores de virulencia y genes de resistencia a antibióticos en <i>Klebsiella pneumoniae</i> M4g.....	61
10 Contenido de factores de virulencia y genes de resistencia a antibióticos en <i>K. quasipneumoniae</i> Fv4a.	63
11 Perfil de plásmidos presente en el genoma de las cepas de <i>E. coli</i> y <i>Klebsiella</i> analizadas.	64
12 Resultados del programa PathogenFinder.....	65
13 Genes asociados a resistencia a antibióticos de acuerdo con la base de datos RESFINDER-v4.0.....	66
14 Predicción de fenotipo de resistencia con el servidor RESFINDER-v4.0.	67
15 Lista de genomas de <i>Escherichia</i> utilizados para la construcción de árbol filogenético y pangenoma	69
16 Lista de genomas de <i>Klebsiella</i> utilizados para la construcción del árbol filogenético y pangenoma	69

RESUMEN

La producción de fresa en Culiacán, Sinaloa, es una importante actividad económica del sector agrícola. La mayor parte de la producción se realiza en plantíos de una hectárea, ubicados a orillas del río Culiacán y de los canales de riego que de éste derivan, inclusive dentro del área urbana. La ubicación y manejo del cultivo, las características del fruto, así como su consumo en fresco hacen de las fresas un potencial vehículo de bacterias entéricas como las del grupo Coliformes de las que algunas especies podrían ocasionar infecciones gastrointestinales. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de bacterias coliformes en diferentes matrices en la cadena de producción de fresa, caracterizar su fenotipo y genotipo (factores de virulencia, genes de resistencia a antibióticos), y determinar si éstas representan un riesgo al consumidor. Para ello se analizaron 25 muestras en total, incluyendo agua de irrigación, fruto precosecha, manos durante cosecha, recipientes y fruto en venta. Se realizó la evaluación de resistencia a antibióticos mediante la prueba de difusión en disco, cinco aislados fueron seleccionados para secuenciación de genoma completo y se utilizaron herramientas bioinformáticas del servidor del Centro de Epidemiología Genómica (CGE) de la Universidad Técnica de Dinamarca para la caracterización in silico de los genomas. Posteriormente se construyó el pangenoma con el programa anvio v6.2 y se elaboraron árboles filogenéticos. Del total de 25 muestras analizadas el 64 % (16/25) presentó coliformes totales (CT), y el 56 % (14/25) coliformes fecales (CF). Las concentraciones de CT variaron desde 9.1 NMP/g en fruto en venta hasta 2.5×10^5 NMP/100mL en agua de irrigación. Los CF variaron desde 3 NMP/g en fruto en venta, hasta 2.4×10^5 NMP/100mL en agua. Los aislados A3a, A4b, S4b se identificaron como *E. coli* serotipos O17/O77:H18, O111:H4 y H14, respectivamente. Los aislados M4g y Fv4a se identificaron como *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella quasipneumoniae*, respectivamente. Todas las cepas presentaron resistencia a ampicilina; los aislados A3a y A4b presentaron resistencia a tetraciclina y ciprofloxacino. El pangenoma estuvo constituido por 7811 genes en *E. coli* y 9316 en *Klebsiella*. De acuerdo con el programa PathogenFinder los aislados A3a, A4b, S4b, M4g, Fv4a tienen una probabilidad de ser patógenos para el humano de 0.936, 0.936, 0.946, 0.755 y 0.855, respectivamente. Los resultados sugieren que las bacterias coliformes presentes en la cadena de producción de fresa poseen un perfil genotípico y fenotípico con potencial para ocasionar efectos adversos en la salud.

Palabras clave: *E. coli*, *Klebsiella*, resistencia a antibióticos, genes de virulencia.

ABSTRACT

Strawberry production in Culiacan, Sinaloa, is an essential economic activity for the agricultural sector. Most of the production is carried out in plantations of one hectare, located on the banks of the Culiacan River and the irrigation channels that derive from it, even within the urban area. The location and management of the crop, characteristics of the fruit, and its fresh consumption make strawberries a potential vehicle for enteric bacteria such as the coliforms group, which some species could cause gastrointestinal infections. The objective of this work was to determine the presence of coliform bacteria in different matrices of strawberry production, characterize their phenotype and genotype (virulence factors, antibiotic resistance genes), and determine if they represent a risk to the consumer. A total of 25 samples were analyzed, including irrigation water, pre-harvest fruit, hands during harvest, containers, and fruit for sale. Five isolates were sequenced, using SPAdes v3.0 for assembly, and the RAST server for annotation. Bioinformatics tools from the Center for Genomic Epidemiology (CGE) server from the Denmark Technical University were used. Antibiotic resistance evaluation was performed using the disk diffusion test. The pangenome was built with the anvio v6.2 program, and phylogenetic trees were made with the results of the core genome. Of the total of 25 samples analyzed, 64% (16/25) presented total coliforms (TC), and 56% (14/25) fecal coliforms (CF). TC concentrations ranged from 9.1 MPN / g in fruit for sale to 2.5×10^5 MPN / 100ml in irrigation water. The CF varied from 3 MPN / g in fruit for sale to 2.4×10^5 MPN / 100ml in water. Isolates A3a, A4b, S4b were identified as *E. coli* serotypes O17 / O77: H18, O111: H4, and H14, respectively. The isolates M4g and Fv4a were identified as *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella quasipneumoniae*, respectively. All the strains showed resistance to ampicillin, isolates A3a and A4b showed resistance to tetracycline and ciprofloxacin. The pangenome consisted of 7811 genes in *E. coli* and 9316 in *Klebsiella*. According to the PathogenFinder program, the probability that isolates A3a, A4b, S4b, M4g, Fv4a are pathogenic for humans was 0.936, 0.936, 0.946, 0.755, and 0.855, respectively. The results suggest that the Coliform bacteria present in the strawberry production chain have a genotypic and phenotypic profile that can cause adverse health effects.

Key words: *E. coli*, *Klebsiella*, antibiotic resistance, virulence genes.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de transmisión alimentaria representan un problema grave de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Se estima que cada año 550 millones de personas (aproximadamente una de cada 10) contraen una enfermedad transmitida por alimentos, lo que implica pérdidas económicas y reducción en la calidad de vida de la población (WHO 2015). A nivel mundial, las bacterias mayormente reportadas como responsables de gastroenteritis por el consumo de alimentos son *Campylobacter*, *Salmonella*, *E. coli* productora de toxina shiga (STEC), *Shigella* y *Listeria* (CDC, 2018; ECDC, 2018; WHO, 2015). A este grupo de bacterias frecuentemente se les conoce como “enterobacterias” por provenir del tracto intestinal de animales y humanos infectados. Las enterobacterias se encuentran ampliamente distribuidas en cuerpos de agua superficial, los cuales se contaminan con heces de animales domésticos y salvajes, así como de agua residual urbana (Haley *et al.*, 2009). Esto ha provocado que el agua de irrigación se convierta en un vehículo importante de microorganismos patógenos que llegan a contaminar cultivos de frutas y hortalizas, comprometiendo su inocuidad y la salud de las personas que las consumen (Uyttendaele *et al.*, 2015). Un patógeno en específico que no se señala dentro de los principales agentes etiológicos de gastroenteritis es *Klebsiella pneumoniae*, y se ha asociado principalmente a infecciones nosocomiales y sintomatología extraintestinal; sin embargo, durante los últimos años se ha presentado un aumento en el reporte de casos de infecciones por *Klebsiella*, así como evidencia que demuestra la transmisión de este patógeno a través del consumo de alimentos contaminados (Yangjin *et al.*, 2015; Ipek Kurtböke *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018; Shuhong *et al.*, 2018).

En el caso de productos frescos como frutas y verduras, las bacterias que se reportan con mayor frecuencia como agentes etiológicos de brotes son *Salmonella* y algunos patotipos de *E. coli*, como las *E. coli* productoras de toxina shiga (STEC) (CDC, 2018; ECDC, 2018).

La fresa es uno de estos cultivos en riesgo de causar problemas a la salud de los consumidores (brotes diarreicos) y pérdidas económicas. Es un cultivo de gran importancia económica nacional y regional. México es considerado el tercer productor de fresa a nivel mundial, con un volumen de producción estimado de 861 337 toneladas durante el año 2020 (SIAP, 2020). En el 2018, Sinaloa ocupó el puesto número 10 a nivel nacional como productor de fresa, con una producción estimada de 330 toneladas (SIAP, 2019). El ciclo de cultivo de fresa en Sinaloa abarca un periodo de 6 meses

y la producción está destinada principalmente al mercado local. En el valle de Culiacán, la producción de fresa es una actividad realizada por un número considerable de pequeños productores, con cultivos de alrededor de una hectárea por productor, los cuales se ubican a las orillas del río Culiacán y canales que de éste derivan, incluso dentro de la zona urbana de Culiacán (EL DEBATE, 2018). La fresa se caracteriza por ser un fruto muy sensible al manejo y se deteriora fácilmente con la manipulación, por lo que el tratamiento postcosecha es mínimo o prácticamente nulo. Esto, aunado a las actividades agrícolas de la región y al consumo en fresco del fruto hacen de la fresa un potencial vehículo de microorganismos patógenos (Potencial fresa mexicana, 2017). La fresa y cualquier otro producto fresco puede ser contaminado por distintos factores, los cuales son considerados en los sistemas de inocuidad de productos frescos como el sistema de reducción de riesgos de contaminantes (SRRC), el cual señala la aplicación de medidas preventivas en el agua de irrigación, el personal, las áreas de producción, procesamiento y empaque, al considerar estos como posibles fuentes de contaminación (SENASICA, 2015).

Uyttendaele y colaboradores (2015), señalan que el agua de irrigación y las manos de los trabajadores son las principales fuentes de contaminación en el cultivo de fresa. En México, la comisión nacional del agua realiza un monitoreo anual de la calidad del agua superficial (ríos y canales); para esto, analiza 7 parámetros, donde se incluye la cuantificación de Coliformes totales, Coliformes fecales y *E. coli* (CONAGUA, 2018). Sin embargo, poco se ha hecho por determinar los factores de virulencia de estos grupos bacterianos. Los reportes de la concentración de Coliformes totales, Coliformes fecales y *E. coli* en 2017, señalan que el agua superficial se encuentra altamente contaminada en la mayoría de los puntos de monitoreo ubicados en Sinaloa (CONAGUA, 2018). Las heces de humanos y animales contaminan el medio ambiente y cuerpos de agua superficial, donde se ha encontrado *E. coli*, la cual puede presentar una alta resistencia a antibióticos, esto ha sido reportado tanto en países desarrollados y en vías de desarrollo (Dhanji *et al.*, 2011). El uso de antibióticos en diferentes actividades productivas como la ganadería, industria, así como en el sector salud y doméstico son importantes impulsores de resistencia a antibióticos por la liberación de éstos al ambiente, contaminando los cuerpos de agua (Diwan *et al.*, 2010; Leverstein-van Hall *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2015).

Estudios científicos han demostrado la presencia de enterobacterias como *Salmonella*, *E. coli* y *Klebsiella* en la cadena de producción y también en frutos de fresa (Kurtboke *et al.*, 2016). La presencia de estos microorganismos en la cadena de producción de fresa, aunado a la creciente

resistencia a antibióticos en las bacterias, representa un riesgo a la salud de los consumidores, por lo que es importante el monitoreo microbiológico de este producto (Kim *et al.*, 2015). Actualmente es posible utilizar tecnologías de secuenciación de genoma completo y herramientas bioinformáticas para la caracterización de estos microorganismos. La secuenciación, ensamble y anotación de genomas permite conocer los genes de resistencia a antibióticos, así como otros factores de virulencia; lo que permite establecer el grado de riesgo al que los consumidores están expuestos, y de ser así, los posibles antibióticos que podrían ser utilizados para su tratamiento (Shendure y Hi, 2008). Una manera de analizar la información generada en la secuenciación de genomas es el estudio del pangenoma, el cual consiste en identificar la totalidad de genes presentes en los genomas de cada aislado bacteriano (Tettelin y Medini, 2020). Con esto, es posible establecer relaciones filogenómicas, considerando los genes presentes en todos los genomas. El pangenoma se puede dividir en subgrupos, dependiendo del enfoque del análisis, principalmente, se divide en genoma “core”, que se integra por los genes presentes en todos los genomas analizados, generalmente aquellos necesarios para la vida del microorganismo, además, podemos encontrar el genoma “accesorio”, el cual incluye genes persistentes y genes presentes en solo un genoma (singletons) (Delmont y Eren 2018; Erent *et al.*, 2015).

Por lo tanto, el presente trabajo de investigación se realizó con la finalidad de determinar la concentración de bacterias Coliformes presentes en la cadena de producción de fresa, incluyendo agua de irrigación, fruto precosecha, superficies de contacto durante la cosecha, manos de trabajadores y fruto en el punto de venta. Así mismo, se identificó el perfil fenotípico y contenido genético relacionado con resistencia a antibióticos, así como los factores de virulencia de las cepas aisladas utilizando herramientas bioinformáticas. Finalmente, se construyeron los pangenomas de *E. coli* y *Klebsiella* de los 5 aislados seleccionados para establecer sus relaciones filogenómicas.

2. ANTECEDENTES

2.1. Agentes Causales de Gastroenteritis

Las enfermedades de transmisión alimentaria representan un problema importante de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Las enfermedades diarreicas se encuentran dentro de las 10 principales causas de mortalidad a nivel mundial. Son consideradas la séptima causa de mortalidad en países desarrollados y en países en vías de desarrollo se encuentran entre las 5 principales. No obstante, durante los últimos años (2000-2019) se ha presentado una disminución en la mortalidad por este tipo de enfermedades (WHO 2020). Se estima que cada año se presentan 550 millones de infecciones asociadas al consumo de agua y alimentos contaminados (aproximadamente una de cada 10 personas en el mundo), lo que implica pérdidas económicas y reducción en la calidad de vida de la población (WHO 2015). Los alimentos pueden contaminarse, ya sea con agentes químicos, físicos y biológicos, siendo estos últimos los que se presentan con mayor frecuencia (WHO 2015).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, se han descrito más de 250 agentes biológicos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos, de los cuales, 31 son los que se identifican con mayor frecuencia en brotes a nivel mundial (WHO 2015). Estos microorganismos incluyen virus, protozoarios y bacterias. Los géneros de bacterias mayormente reportados como agentes causales de gastroenteritis a nivel mundial son *Campylobacter*, *Salmonella*, *E. coli* (productora de toxina shiga STEC), *Shigella* y *Listeria* (CDC, 2018; ECDC, 2018; WHO 2015). En el caso de productos frescos, como frutas y verduras, las bacterias que se reportan con mayor frecuencia como responsables de brotes son *Salmonella* y algunos patotipos de *E. coli* como STEC (CDC, 2018; ECDC, 2018).

Los síntomas de infecciones por *E. coli* pueden variar de persona a persona, pero generalmente incluyen dolor abdominal severo, diarrea (con sangre, dependiendo del patotipo) y vómitos (CDC 2017). Así mismo, del 5 al 10 % de las personas diagnosticadas con infecciones por *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) sufren una complicación potencialmente de por vida, conocida como síndrome urémico hemolítico (Croxen *et al.*, 2013).

Cabe señalar que las enfermedades transmitidas por alimentos no solo se limitan a aquellas asociadas con síntomas gastrointestinales, algunos patógenos pueden causar infecciones extraintestinales, además, actualmente se han reportado patógenos emergentes, los cuales no se asociaban a ser transmitidos por alimentos (Riley, 2020). Esto representa un cambio en el paradigma de los grupos microbianos asociados a enfermedades transmitidas por alimentos, el cual se enfoca principalmente en las infecciones gastrointestinales y agentes etiológicos comunes, lo que implicaría una cifra subestimada del número real de casos reportados anualmente (Riley, 2020). Un patógeno en específico para ejemplificar esta situación es *Klebsiella pneumoniae*, asociado principalmente con infecciones nosocomiales y sintomatología extraintestinal, sin embargo, durante los últimos años se ha presentado un aumento generalizado en el reporte de casos de infecciones por *Klebsiella*, así como evidencia que demuestra la transmisión de este patógeno a través del consumo de alimentos contaminados (Liu *et al.*, 2018; Yangjin *et al.*, 2015; Shuhong *et al.*, 2018; Ipek Kurtböke *et al.*, 2016).

En México, el boletín epidemiológico semanal emitido por el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) reportó un total de 5,285,200 casos de infecciones gastrointestinales causadas por otros microorganismos y mal definidas a nivel nacional durante 2018 (DGE, 2019). En esta categoría se agrupan los casos de infecciones gastrointestinales causadas por *E. coli*, *Campylobacter*, *Yersinia*, virus como Hepatitis A, Norwalk, y Adenovirus (OPS, 1995). Así mismo, en Sinaloa se reportaron 152,575 casos de infecciones intestinales (DGE, 2019). Estos datos a pesar de no especificar el número de casos para cada agente etiológico son relevantes, ya que muestran una tasa elevada en comparación con otras regiones y países (DGE, 2019; CDC, 2020; EFSA, 2017). Pese a que el número de casos reportados es elevado, en México no se cuenta con un reporte de brotes asociados a alimentos donde se confirme la fuente y el agente etiológico de la enfermedad. Un ejemplo de este sistema es el que posee el Centro de control y prevención de enfermedades de Estados Unidos (CDC), mediante el sistema Foodnet, donde se reporta el número de casos de enfermedades transmitidas por alimentos, el microorganismo asociado a este brote, así como el alimento que consumieron las personas al enfermarse (CDC, 2017). Por su parte, el centro de control de enfermedades europeo (ECDC, siglas en inglés), en su reporte anual señala los brotes de infecciones, el alimento que fue el vehículo, así como el agente etiológico que se identificó (EFSA, 2017).

2.2. Patógenos Entéricos

2.2.1. *Escherichia coli*

El género *Escherichia* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y consta de cinco especies (*Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia albertii*, *Escherichia hermanii* y *Escherichia vulneris*) (Liu *et al.*, 2018). Entre estas especies y clados, *E. coli* ha sido la más estudiada en una amplia gama de campos de investigación, como genética, bioquímica, biología molecular y biotecnología (Ooka *et al.*, 2015). Se encuentra principalmente colonizando el tracto intestinal de mamíferos, incluyendo al ser humano. Es una bacteria Gram-negativa, oxidasa negativa, con forma de bacilo y puede crecer tanto en condiciones aerobias como anaerobias, preferentemente a 37 °C y puede presentar o no motilidad mediante flagelos peritricos (Natarokaper, 1998).

La clasificación clásica se basa en el esquema de serotipificación de Kauffman, donde se determinan los antígenos somáticos O (polisacáridos) y los antígenos flagelares H (proteínas). También se pueden utilizar métodos moleculares como PCR de genes implicados en la biogénesis del antígeno O (por ejemplo, *wzx* y *wzy*) y de *fliC* para el antígeno H, para identificar el serotipo (DebRoy *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2003). Una designación de NM o H indica una ausencia del antígeno H y que el aislado no es móvil. Actualmente se reconocen 174 antígenos somáticos O de *E. coli* (DebRoy *et al.*, 2011) y 53 flagelares H (Wang *et al.*, 2003); sin embargo, sólo un pequeño subconjunto de combinaciones de O:H se asocia con casos de infecciones. La mayoría de los factores de virulencia presentes en cepas patogénicas de *E. coli* derivan de elementos genéticos móviles como transposones, bacteriófagos y plásmidos, que pueden estar integrados en el cromosoma o replicándose dentro del hospedero para proveer nuevas características y ventajas (Croxen *et al.*, 2013). Por ejemplo, la mayoría de los genes de toxinas y factores de colonización se encuentran principalmente en plásmidos (Qadry *et al.*, 2005). Algunos patotipos como *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) y *E. coli* enteropatógena (EPEC) comparten “clusters” de genes de virulencia en islas de patogenicidad; por ejemplo, el locus de eliminación de enterocitos (LEE), que es necesario para que algunos patotipos presenten el fenotipo de adhesión/desgaste como parte de su virulencia (McDaniel *et al.*, 1995).

2.2.1.1 Patotipos de *E. coli*. Las variantes patogénicas de *E. coli* pueden causar una variedad de enfermedades diarreicas en humanos, esto debido a la presencia de factores de virulencia específicos asociados a cada patotipo. Las cepas de *E. coli* causantes de enfermedades diarreicas se han clasificado en 6 patotipos principales (Figura 1), que incluyen: *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) (Nataro y Kaper, 1998; Croxen *et al.*, 2013).

2.2.1.2 *E. coli* enteropatógena. Este fue el primer patotipo reportado de las *E. coli* diarreagénicas y el término EPEC se utilizó por primera vez en 1955 (Neter *et al.*, 1995). Pertenecen a un grupo de bacterias patógenas cuya característica principal es la adherencia a las células epiteliales y causar lesiones particulares en las microvellosidades del intestino, las cuales se conocen como lesiones de adhesión/desgaste (Karper *et al.*, 2004). Esta característica se atribuye a la presencia de la isla de patogenicidad LEE; a su vez, este patotipo se clasifica en subtipos típico y atípico, esto con base en la presencia o ausencia del plásmido conocido como factor de adhesión de *E. coli* (pEAF, por sus siglas en inglés) (Trabulsi *et al.*, 2002).

2.2.1.3 *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC). Este patotipo se caracteriza por la presencia de los genes de toxina shiga 1 o 2 (stx1 o stx2). A pesar de que se han identificado más de 400 serotipos de STEC, solo un grupo reducido de éstos han sido relacionados con infecciones en humanos (Blanco *et al.*, 2014). Este patotipo tan diverso puede causar diarrea severa, incluyendo sangrado hasta complicaciones como colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y la muerte (Croxen *et al.*, 2013). Este patotipo incluye un subgrupo, denominado *E. coli* enterohemorrágica (EHEC, por sus siglas en inglés). Estas se caracterizan por ser LEE positivas, sin embargo, algunos serotipos no presentan esta región en su genoma y aun así son agrupados en esta categoría debido a su similitud genética (Nataro y Kaper, 1998). El serotipo O157:H7 es el mejor conocido de este patotipo EHEC y es el que más se ha estudiado a nivel molecular en cuanto a mecanismo de patogénesis (Croxen *et al.*, 2013).

2.2.1.4 *E. coli* enterotoxigénica (ETEC). Es un patotipo diverso en cuanto a la presencia de serotipos de *E. coli*, es la mayor causa de diarrea del viajero y una causa endémica en países en vías de desarrollo. ETEC puede ser aislada en portadores sintomáticos y asintomáticos, sin embargo, representa una mortalidad importante en niños. *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) se caracteriza por la producción de una enterotoxina, ya sea termolábil o termo-resistente y también por utilizar factores de colonización para unirse a las células intestinales del huésped (Qadri *et al.*, 2005).

2.2.1.5 *E. coli* enteroagregativa (EAEC). Este patotipo fue identificado después de la comparación de los patrones de adherencia de más de 500 aislados de un estudio realizado en 1987 (Nataro *et al.*, 1987). Desde su identificación, EAEC ha sido identificado en casos endémicos y epidémicos de diarrea; además, en algunos estudios a gran escala se ha encontrado que este patotipo es el patógeno mayormente identificado en muestras de heces en casos de diarrea causada por *E. coli* (Nataro *et al.*, 2006). En general, el mecanismo de patogénesis de EAEC consiste en tres etapas: (1) adherencia a la mucosa intestinal, (2) producción de enterotoxinas y citotoxinas, y (3) inflamación de las mucosas. Durante la primera etapa de patogénesis, la adherencia a la mucosa intestinal de EAEC se asocia con adhesinas fimbriales (fimbrias de adhesión agregadas [AAF]) y afimbriales. Por lo general, estas adhesinas están codificadas en el plásmido pAA, el cual también codifica AggR que es un factor de transcripción que regula la síntesis de las adhesinas (Dudley *et al.*, 2006). En la segunda etapa de patogénesis de EAEC se han descrito y revisado muchos supuestos factores de virulencia (toxinas), como Pet, una toxina que altera la estructura del citoesqueleto, EAST-1, una enterotoxina estable al calor, producida por otros patógenos además de EAEC, ShET1, y Pic, una mucinasa que comparten diferentes cepas de *E. coli* patógenas y *Shigella*. Durante la etapa final del modelo de patogénesis de EAEC hay múltiples factores que influyen en la escala de inflamación, incluyendo la respuesta inmune del hospedero y la cepa de EAEC (Nataro *et al.*, 1994).

2.2.1.6 *E. coli* de adherencia difusa (DAEC). Este patotipo se describe como cepas de *E. coli* que se unen a las células epiteliales, pero no con el clásico patrón de adherencia, como adherencia localizada o formación de lesiones A/E. Este se dispersa sobre las superficies de células

intestinales, lo que resulta en un patrón de adherencia difusa (DA) (Croxen et al., 2013). DAEC se caracteriza por la presencia de sistemas de adquisición de hierro, toxinas, adhesinas y factores de resistencia al sistema inmune como parte de su patogenicidad, de la cual hay poca información. El patotipo de adherencia difusa comparte cierta similitud con el patotipo de *E. coli* enteroagregativa (Meza-Segura et al., 2020). Al igual que EAEC, el patotipo de adherencia difusa se clasificó con base en su patrón de adherencia en células Hep-2. Este patrón es promovido por las adhesinas Afa, F1845 y Dr, codificadas por los operones afa, daa y dra, respectivamente (Servin, 2014).

2.2.1.7 *E. coli* adherente-invasiva (AIEC). El patotipo de *E. coli* adherente-invasiva no expresa factores de virulencia comunes como otros patotipos de *E. coli*, no obstante, las características genéticas y fenotípicas de este patotipo no están del todo elucidadas, además que la predisposición del hospedero a presentar enfermedad de Crohn o colon inflamado y otros factores influyen en la patogenicidad de este patotipo (Nash et al., 2010). Coloniza las mucosas intestinales de los pacientes con la enfermedad de Crohn y es capaz de invadir las células epiteliales y replicarse dentro de los macrófagos. AIEC utiliza pilis tipo I para adherirse a las células intestinales y prolongar fimbrias polares que contribuyen a la invasión (Croxen et al., 2013).

2.2.1.8 *E. coli* enteroinvasiva (EIEC). Este patotipo comparte ciertas características bioquímicas, genéticas y patogénicas con *Shigella* (Nataro-kaper, 1998). En general, *Shigella* no presenta motilidad, no fermenta lactosa, es lisina descarboxilasa negativa; estas y otras características también aplican para la mayoría de las cepas EIEC. Alrededor de 21 serotipos con antígeno O están presentes en este patotipo, en algunas ocasiones también pueden presentar antígeno H.

Los avances en el estudio de *S. flexneri* proporcionan la base para la comprensión actual de la patogénesis de EIEC y *Shigella* a nivel celular y molecular (Croxen et al., 2013). La infección exitosa depende de determinantes de virulencia esenciales que están codificados por loci cromosómicos y plásmídicos. Los factores de virulencia codificados por plásmidos incluyen componentes del complejo de agujas T3SS (proteínas Mxi-Spa), chaperonas (IpgA, IpgC, IpgE y Spa15), reguladores transcripcionales (VirF, VirB y MxiE), y aproximadamente 25 proteínas efectoras (Schroeder-Hilbi, 2008). La infección por *Shigella* es un proceso de varios pasos que implica la penetración de la barrera epitelial, la inducción de la muerte de las células macrófagas,

la invasión por IEC, la supresión de la respuesta inmune, el movimiento intra e intercelular y la modulación de la integridad epitelial (Croxen *et al.*, 2013).

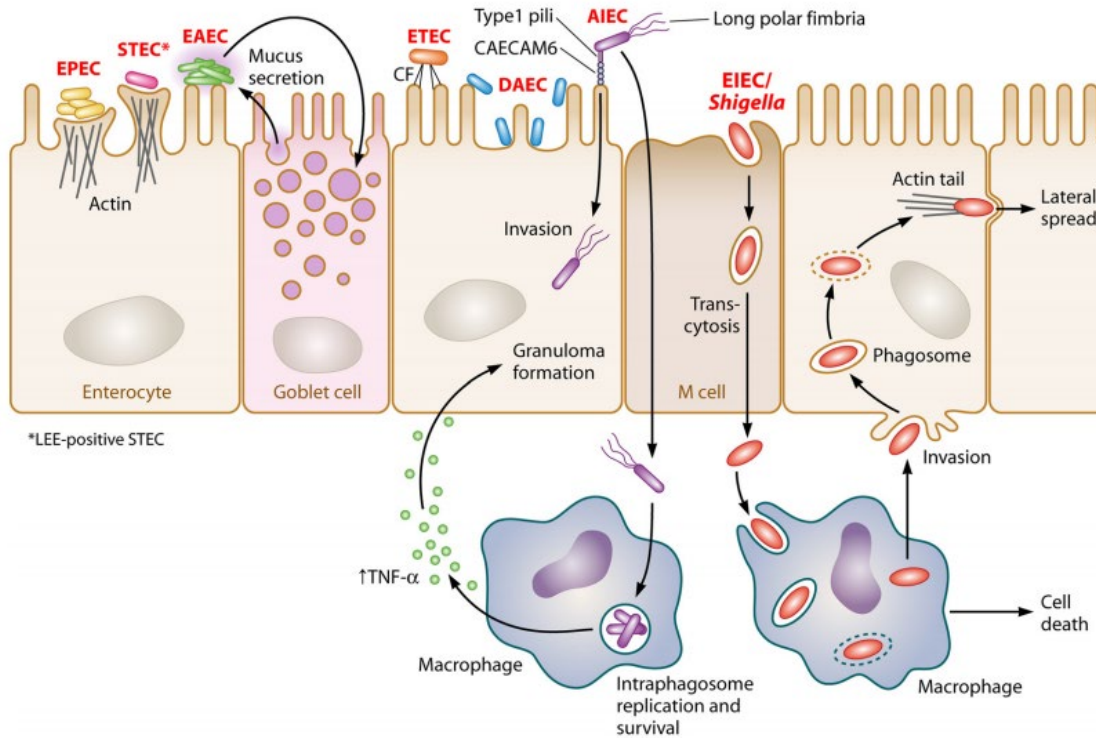


Figura 1. Adhesión de los diferentes patotipos de *E. coli*. Los patotipos EPEC (amarillo) y STEC LEE-positivas (rosa) son patógenos extracelulares que se adhieren al epitelio intestinal y borran o desgastan las microvellosidades formando lesiones características A/E. EPEC es capaz de formar colonias debido a la presencia de pilis, lo que resulta en un patrón de adherencia (LA). *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) (representada en naranja) usa factores de colonización (CF) para unirse a las células intestinales del huésped. *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (representada en verde) forma biopelículas en la mucosa intestinal y las bacterias se adhieren entre sí y a la superficie celular para formar un patrón de adherencia agregada (AA) conocido como "ladrillo apilado". *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (representada en azul) se dispersa sobre las superficies de células intestinales, lo que resulta en un patrón de adherencia difusa (DA). *E. coli* invasiva adherente (AIEC) (representada en púrpura) coloniza las mucosas intestinales de los pacientes con la enfermedad de Crohn y es capaz de invadir las células epiteliales y de replicarse dentro de los macrófagos. Este patotipo utiliza pilis tipo I para adherirse a las células intestinales y prolongar fimbrias polares que contribuyen a la invasión. *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) / *Shigella* (representadas en rojo) son patógenos intracelulares que penetran el epitelio intestinal a través de las células M para acceder a la submucosa. Tomado de Croxen *et al.*, (2013).

2.2.2. *Klebsiella*

Klebsiella es un género bacteriano Gram-negativo, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, ubicuo, que carece de motilidad. Existen diversas especies de *Klebsiella*, las cuales poseen genomas relativamente grandes, eso permite que presenten flexibilidad metabólica y por lo tanto éxito en la colonización de nichos clínicos y/o ambientales (Casewell *et al.*, 1977). Diversas investigaciones han demostrado que *Klebsiella* spp. es uno de los comensales predominantes en productos frescos y de gran importancia en la resistencia a antibióticos (Jung *et al.*, 2015). En mamíferos, *Klebsiella pneumoniae* es una especie común en el tracto intestinal. Puede ser fácilmente aislada de superficies mucosas, manos contaminadas con heces (Casewell *et al.*, 1977), aguas residuales y también superficies de áreas hospitalarias (Bagley, 1985; Rock *et al.*, 2014). Hoy en día, *K. pneumoniae* es la especie patógena más común de este género y es reconocido como un patógeno oportunista causante de un gran número de infecciones nosocomiales (Rastegar *et al.*, 2019).

La mayoría de las infecciones ocasionadas por *Klebsiella pneumoniae* en Estados Unidos y Europa son debidos a cepas denominadas “clásicas de *Klebsiella pneumoniae* (Kpc)” y ocurren principalmente en ambientes hospitalarios. Las cepas de *Klebsiella pneumoniae* clásicas son de relevancia clínica debido a su facilidad de adquirir plásmidos que contienen genes de virulencia y de resistencia a antibióticos (Grover *et al.*, 2006). Sin embargo, ha aumentado el número de casos asociados con un patotipo diferente de las cepas clásicas de *Klebsiella pneumoniae* (Russo, 2018). A mediados de los años 90s, en Taiwán, se reportaron casos clínicos únicos de infecciones por *Klebsiella pneumoniae* tejido-invasivas, que se presentaron incluso en individuos sanos (Liu *et al.*, 1986). Estos casos incluyeron síntomas como absceso hepático piógeno en ausencia de enfermedad del tracto biliar, abscesos en sitios no hepáticos, neumonía, endoftalmitis, meningitis y fascitis necrotizante (Liu *et al.*, 1986). Para distinguir este patotipo de las cepas Kpc, se ha utilizado la designación de *Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta (Kphv), así mismo, ha aumentado el reporte del número de casos de este patotipo en todo el mundo (Russo, 2018).

Hoy en día se conocen factores de virulencia que permiten o aumentan la severidad de las infecciones causadas por *K. pneumoniae*. Las cepas hipervirulentas por lo general presentan factores de virulencia como sistemas sideróforos, colibactina y un fenotipo de hipermucoviscosidad (Figura 2) (Rastegar *et al.*, 2019).

2.2.2.1 Sideróforos adquiridos en cepas de *Klebsiella*. Los sistemas sideróforos comprenden moléculas quelantes de hierro que pueden tomar de forma competitiva el hierro de las proteínas del huésped u otras fuentes y receptores de superficie para la internalización de éste. Se han descrito 4 sistemas en *K. pneumoniae*: un sistema sideróforo central (codificado por el gen *ent*) y sideróforos accesorios o adquiridos “yersiniabactina”, “aerobactina” y “salmoquitina” (codificados por los genes *ybt*, *iuc* e *iro*, respectivamente) (Russo, 2018).

2.2.2.2 Colibactina en cepas de *Klebsiella*. La colibactina es un policétido genotóxico, que induce daño al ADN en células eucariotas, fue descrito por primera vez en *E. coli*, pero también se encuentra en aproximadamente el 10 % de cepas de *K. pneumoniae*. La colibactina promueve la colonización de la mucosa intestinal y diseminación a la sangre y otros órganos. En *Klebsiella pneumoniae* la colibactina se asocia principalmente con los grupos clonales causantes de absceso hepático como CG66 y CG23 y algunas cepas hipervirulentas (Lai *et al.*, 2014).

2.2.2.3 Hipermucoviscosidad en cepas de *Klebsiella*. La hipermucoviscosidad es quizás el factor de virulencia más conocido para *K. pneumoniae*, pero su base genética y contribución a la enfermedad no son sencillas. El fenotipo se asocia principalmente con sobreproducción de la cápside debido a la presencia de genes reguladores *rmpA1* y *rmpA2*, asociados a plásmidos (Wacharotayankun *et al.*, 1993).

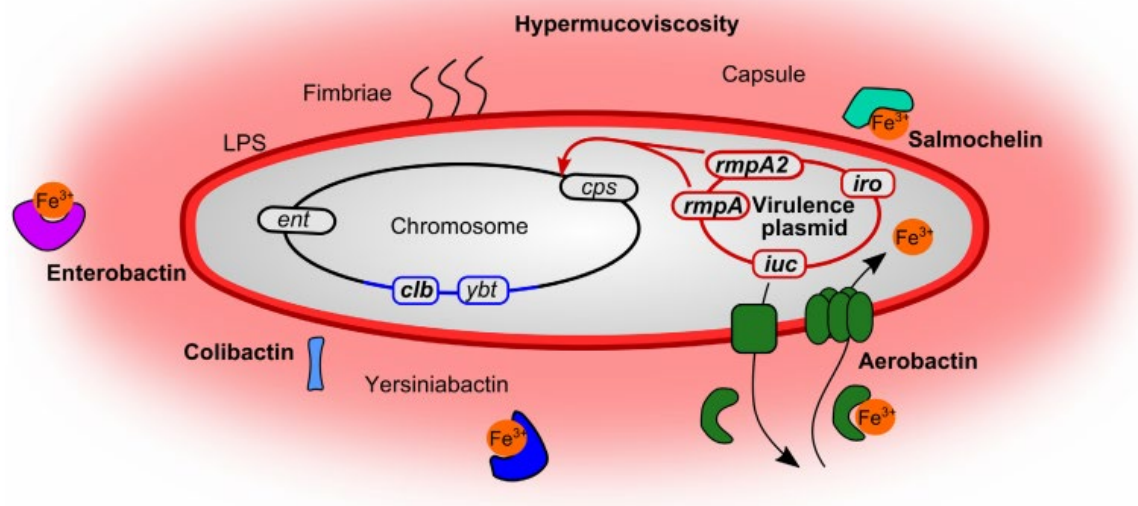


Figura 2. Características genéticas de *Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta. La hipervirulencia está mediada por factores genéticos presentes en el cromosoma y en plásmidos (negritas), estos en adición a factores que contribuyen en la patogénesis de las cepas clásicas de *Klebsiella pneumoniae* (sin negritas). Tomado de: Choby *et al.*, 2020.

2.3. Resistencia a Antibióticos

El uso de antibióticos en terapéutica clínica, en la agricultura y ganadería, los desechos y efluentes de hospitales y fábricas, son importantes impulsores de la dispersión de microorganismos con múltiple resistencia a antibióticos (Diwan *et al.*, 2010). Las heces de humanos y animales contaminan el medio ambiente y los cuerpos de agua superficial donde se ha encontrado *E. coli* altamente resistente, esto se ha presentado tanto en países desarrollados, así como en aquellos en vías de desarrollo (Dhanji *et al.*, 2011). Los patógenos resistentes a antibióticos también son comunes en alimentos frescos y en la producción de ganado (Leverstein-van Hall *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2015).

Los mecanismos mediante los cuáles las enterobacterias lidian con la presión selectiva de antibióticos incluyen la modificación del blanco, expulsión del antibiótico mediada por proteínas de membrana, modificación del antibiótico. La figura 3 muestra los principales mecanismos de resistencia a antibióticos presentes en enterobacterias (Iredel *et al.*, 2016).

La presencia de betalactamasas de espectro extendido (ESBL, por sus siglas en inglés) confiere

resistencia a algunas penicilinas y cefalosporinas, y en algunas ocasiones se presenta junto a otros mecanismos que confieren resistencia a otro tipo de antibiótico. La prevalencia de la resistencia mediada por ESBL en *E. coli* y en *Klebsiella pneumoniae* varía ampliamente entre los países, y se presume que esté asociado a factores como la disponibilidad y restricción de antibióticos, aguas residuales, tratamiento de aguas y estándares generales de vida y cuidado médico (Russo y Marr 2019).

La resistencia de las enterobacterias a los antibióticos, especialmente del tipo β -lactámico, está cada vez más dominada por la movilización de genes únicos que se expresan continuamente y que codifican enzimas eficientes en la modificación de fármacos (Kamruzzaman, *et al.*, 2015). Una fuerte y ubicua presión de selección ha conducido a un cambio de la resistencia "natural", como los mecanismos mediados por las enzimas cromosómicas inducibles, la impermeabilidad de la membrana y las bombas de flujo de fármacos, hasta el paradigma moderno de los grupos de genes móviles, que determinan en gran medida la epidemiología de la resistencia moderna a los antibióticos (Kamruzzaman *et al.*, 2015). De esta manera, la resistencia a los antibióticos está más disponible que nunca para organismos como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, que son causas importantes de casos clínicos (Iredel *et al.*, 2016).

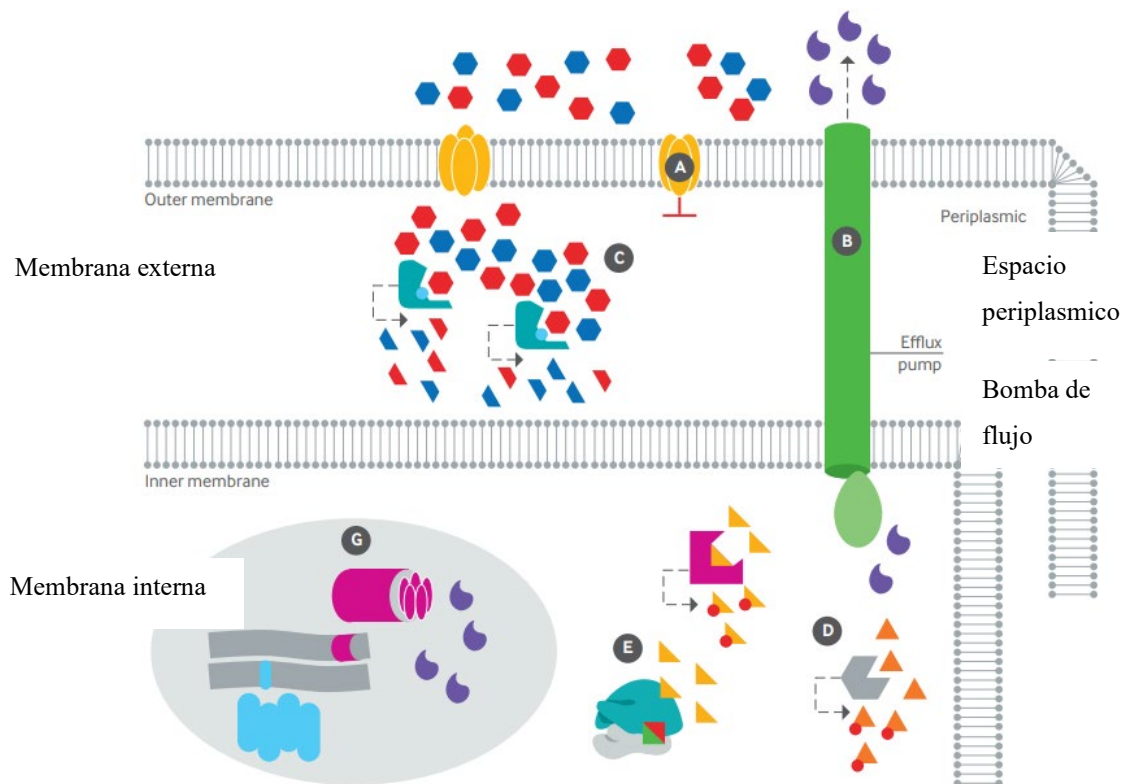


Figura 3. Mecanismos de resistencia a antibióticos. (A) Alteración de porinas o deficiencias en éstas reduce el ingreso de antibiótico. (B) las bombas de flujo transportan los antibióticos fuera de la célula. (C) Las B-lactamasas actúan en el espacio periplásmico hidrolizando antibióticos β -lactámicos, y, por lo tanto, evitan la ruptura de la pared celular. (D) enzimas que modifican antibióticos (modificación de aminoglucósidos). (E) Las metilasas de ARNr 16S previenen la unión de aminoglucósidos. (F) Las mutaciones en los genes de ADN girasa y topoisomerasa IV dirigidos hacen que las fluoroquinolonas sean ineficaces. (G) Las proteínas pentapéptido Qnr evitan la unión efectiva de las fluoroquinolonas a la ADN girasa a través del mimetismo objetivo (tomado de Iredell *et al.*, 2016).

Kim y colaboradores (2015), determinaron la prevalencia y caracterizaron de *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* -ESBL en vegetales listos para consumo. Un total de 189 muestras de vegetales (91 de germinados y 98 de ensaladas) fueron recolectadas de supermercado en Corea del Sur desde octubre de 2012 a febrero de 2013. Encontraron *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli* productoras de ESBL en el 10.1 % de las muestras, de éstas, el 94.7 % fueron germinados. Estas cepas además fueron resistentes a antibióticos no beta-lactámicos, como gentamicina.

Jung y Matthews (2015), evaluaron la presencia de *Klebsiella* en productos como germinados de alfalfa, brócoli, germinados de rábano y germinados combinados. Además, se evaluó la presencia del gen *BLA_{shv}* y de otros genes de virulencia como *rpmA*, *wcaG*, *Alls*, *Kfu*, *IntI_R*. se evaluó

también la resistencia antibióticos mediante difusión en disco de Kirby-Bauer para gentamicina, estreptomicina, imipenem, tetraciclina, ácido nalidíxico, amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina/sulbactam, cefepime, cefotaxima, trimetoprima/sulfametoxazol y cloranfenicol. La resistencia a kanamicina, ciprofloxacino, ampicilina y ceftazidima se evaluó por el método de micro dilución. En este estudio se encontró que la transferencia de genes se da con mayor frecuencia en alimentos sólidos como germinado de alfalfa y lechuga en comparación con matrices líquidas. Así mismo, la temperatura es importante, ya que a 4 °C no se presentó transferencia, pero a partir de 15°, 24° y 37 °C sí se daba transferencia de genes de resistencia como *BLA_{shv}*, además de transferencia de resistencia a tetraciclina, trimetoprima/sulfametoxazol. La exposición de productos frescos a altas temperaturas sirve como un vehículo para la transferencia de genes de resistencia a antibióticos.

2.4. Fuentes de Contaminación de Productos Frescos

Los patógenos transmitidos por los alimentos ingresan al organismo por vía fecal-oral, en la cual se consumen alimentos contaminados con heces humanas o animales (Sapers y Doyle, 2009). En el campo, la contaminación de los productos frescos puede ocurrir a través del contacto directo con heces de humanos u otros animales, suelos o aguas contaminados, a través de una higiene de manos inadecuada, un deficiente saneamiento de equipos, en ocasiones por la aplicación de productos tratados incorrectamente como composta, efluentes agrícolas y escorrentía de aguas pluviales (Lynch *et al.*, 2009). El proceso de producción de frutas y verduras generalmente consiste en pasos sucesivos que por lo regular incluyen cultivo, cosecha, transporte, lavado y empaque (Heredia *et al.*, 2016).

Las fuentes de agua para irrigación incluyen lagos, ríos, mantos acuíferos, efluentes de aguas negras tratadas y en algunas ocasiones aguas no tratadas. Todas las fuentes de agua pueden estar contaminadas con microorganismos patógenos. Investigaciones de trazabilidad sugieren que el agua de irrigación es una fuente de contaminación y un vehículo para la transmisión de patógenos a productos frescos (Liu *et al.*, 2018).

En México, la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) es la dependencia de gobierno

encargada de la legislación de la calidad y el uso del agua. Esta dependencia agrupa los usos del agua en consuntivos y no consuntivos. Durante el año 2017, el 60.9 % del agua destinada a usos consuntivos provenía de fuentes superficiales (ríos, arroyos y lagos), el resto provino de aguas subterráneas. Los usos consuntivos incluyen el agrícola, abastecimiento público, la industria y las termoeléctricas. Durante el 2017, a nivel nacional, el 76 % del agua se destinó al uso agrícola (CONAGUA, 2018a). Sinaloa pertenece a la cuenca hidrológica III Pacífico-Norte, y es la entidad federativa que tiene mayor volumen de agua concesionada para el riego (CONAGUA, 2018a).

Las Normas Oficiales Mexicanas aplicables al agua de riego incluyen la NOM-33-ECOL-1993, que establece las condiciones bacteriológicas para el uso de las aguas residuales de origen urbano o municipal, o de la mezcla de éstas con la de los cuerpos de agua, para el riego de hortalizas y productos hortofrutícolas, y la NOM-CCA/032-ECOL/1993, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las aguas residuales de origen urbano o municipal para su disposición mediante riego agrícola; publicadas en el Diario Oficial de la Federación el 18 de octubre de 1993 (DOF, 1993).

La NOM-33-ECOL-1993 clasifica el agua de irrigación en 5 categorías con base en el contenido de Coliformes fecales, desde excelente, buena calidad, aceptable, contaminada, y fuertemente contaminada. Las concentraciones de cada categoría se encuentran en la figura número 1, así como el semáforo indicativo del Sistema Nacional de Información de Agua utilizado por CONAGUA.

El análisis de la calidad del agua superficial que realiza CONAGUA considera 8 indicadores: demanda bioquímica de oxígeno a cinco días, demanda química de oxígeno, sólidos suspendidos totales, Coliformes fecales (CF), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Enterococcus*, porcentaje de saturación de oxígeno y toxicidad (CONAGUA, 2019). Así mismo, la calidad del agua en sitios superficiales también se determinó a través de un semáforo el cual considera 3 colores, verde, amarillo y rojo y se obtiene integrando los resultados de 8 indicadores antes mencionados (CONAGUA, 2019). El 41.72 % de los sitios se catalogaron con color verde; es decir, los sitios cumplieron con los límites aceptables de calidad del agua para los 8 parámetros analizados, el 29.07 % de los sitios se catalogaron con color amarillo presentando incumplimiento en uno o varios de los siguientes parámetros: *E. coli*, CF, SST y OD %, El 29.21 % de los sitios se catalogaron con color rojo presentando incumplimiento en uno o varios de los parámetros (CONAGUA, 2019).

La calidad microbiológica del agua, respecto a la presencia de Coliformes fecales en el estado de Sinaloa durante 2017 se encontró de contaminada a fuertemente contaminada en la mayoría de los

puntos de monitoreo del agua de irrigación, que incluye ríos, canales y drenes (figura 4).

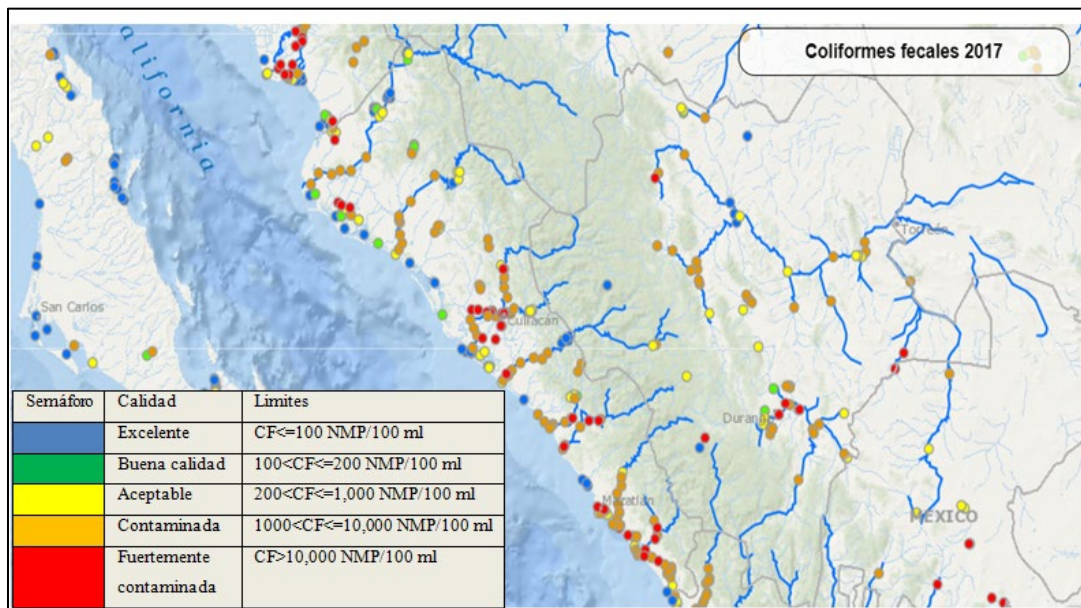


Figura 4. Mapa de monitoreo de la calidad del agua (Coliformes fecales) en Sinaloa durante 2017 (modificado de CONAGUA, 2017).

2.5 Sistema de Reducción de Riesgos de Contaminantes

A raíz de la publicación del acta de modernización de inocuidad alimentaria en Estados Unidos en 2011, las dependencias gubernamentales mexicanas SAGARPA Y SENASICA, buscan que los productores mexicanos implementen las medidas para garantizar las condiciones sanitarias de los alimentos durante los procesos de producción primaria, esto mediante el sistema mexicano de inocuidad, denominado Sistemas de Reducción de Riesgos de Contaminación (SRRC) (SENASICA, 2015).

Los SRRC son las medidas y procedimientos establecidos por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) para garantizar que, durante el proceso de producción primaria, los vegetales se produzcan bajo óptimas condiciones sanitarias al reducir la contaminación física, química y microbiológica. Para promover la implementación y cumplimiento de los SRRC, SENASICA se encarga de la difusión de información, elaboración de

manuales de buenas prácticas, lineamientos y formatos que pueden ser utilizados como guía; así como del seguimiento a las unidades de producción que aplican este sistema. Estos sistemas van dirigidos a las empresas y productores dedicados a la producción primaria de productos agrícolas en sus fases de producción, cosecha y/o empaçado (SENASICA, 2015).

Los SRRC están compuestos de módulos, enfocados en aspectos específicos para la producción de alimentos, y buscan garantizar la inocuidad de los productos. Para que las empresas agrícolas se certifiquen en SRRC deben cumplir con los requisitos señalados en los módulos de: registro de la empresa, infraestructura productiva, manejo del agua, higiene, trazabilidad, capacitación y desarrollo de habilidades, evaluaciones internas y validación de procedimientos (SENASICA, 2016). La implementación de este sistema conlleva una ventaja competitiva de aquellos productores que lo adoptan contra aquellos productores que no lo están haciendo, debido a que la factibilidad de introducir sus productos en el mercado internacional es mayor de quien no lo hace (SENASICA, 2016).

Dentro del SRRC, el agua que se utiliza para la mayoría de los procesos debe ser potable, cumpliendo con lo estipulado en la modificación a la norma oficial mexicana NOM-127-SSA1-1994 "salud ambiental, agua para uso y consumo humano- Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. En esta norma se establece que el agua para uso y consumo humano debe presentar concentraciones de organismos Coliformes totales no detectables, para el caso de organismos Coliformes fecales, *E. coli* u otros microorganismos termo-tolerantes estos deben estar ausentes o en niveles no detectables (DOF, 2002).

En cuanto al agua para riego agrícola, en el SRRC se señala que se debe aplicar un tratamiento preventivo mediante el uso de métodos como filtración o algún tratamiento químico, y asegurar que las sustancias químicas aplicadas no representen un riesgo de daño fisiológico a la planta. Se debe evitar el contacto directo del agua contaminada con los vegetales o las superficies de contacto, así mismo, evitar encharcamientos de agua y riego simultáneo durante el proceso de producción, cosecha y empaçado de productos (SENASICA, 2018).

La aplicación de estas medidas busca asegurar la inocuidad de los alimentos, sin embargo, su implementación depende de cada productor, es decir, es un programa que el productor aplica de manera voluntaria, por lo tanto, algunos productores no los aplican debido a desconocimiento y factores como su solvencia económica. Son los productores que destinan sus productos a la

exportación los que más se apegan a estas medidas, ya que son un requerimiento para la exportación de sus productos.

2.6 Producción de Frutillas.

México se caracteriza por la importante producción agroalimentaria y por ser un exportador de sus productos. En este contexto, las frutillas son el tercer grupo de alimentos de importancia en exportación solo detrás de la cerveza y el aguacate (SIAP, 2018).

Las frutillas también conocidas como ballas o berries son un grupo que incluye arándano, fresa, frambuesa y zarzamora. Actualmente México es el primer productor mundial de Zarzamora, con una producción de más de 287,100 toneladas, siendo Jalisco el principal productor. En la producción de frambuesa, México ocupa el 2do lugar a nivel mundial, con más de 130,100 toneladas, siendo Jalisco el principal productor nacional. En cuanto a la producción de arándano azul, México es considerado el 4 productor mundial, con una producción estimada de más de 40,200 toneladas, destacando Jalisco como el principal productor y Sinaloa como el 3er productor nacional. En el caso de la fresa, es la frutilla que se produce en mayor cantidad en el país. Durante 2018 se produjeron más de 653,600 toneladas (SIAP, 2018).

2.6.1 Producción de Fresa

La fresa, es la frutilla que se produce en mayor cantidad en el país (Potencial fresa mexicana, 2017). Durante 2018 se produjeron más de 653,600 toneladas, de las cuales, más del 50 % fue destinada a la exportación (SIAP, 2018). Destaca el estado de Michoacán como el principal productor nacional, mientras que Sinaloa se encuentra entre los diez primeros estados productores que mayor producción generan y superficie es destinada al cultivo de fresa. Durante el año 2017 se reportaron 30 hectáreas cultivadas con una producción de 360 toneladas (SIAP, 2018). Sin embargo, esta cifra podría ser mayor, ya que hay regiones como el valle de Culiacán donde el cultivo de fresa se ha dado durante más de 10 años por un número considerable de pequeños productores, cultivando

superficies que van desde menos de 1 hectárea hasta 2 o más, las cuales aún no se encuentran registradas en el padrón nacional (SIAP, 2018). De igual manera, puede existir discrepancia entre el volumen de producción de fruto registrado y el que se genera en realidad, ya que la temporada de producción va del mes de enero hasta mediados del mes de junio, teniendo un periodo de máxima producción en los meses de marzo y abril.

Un aspecto de gran importancia en la producción de fresa en el valle de Culiacán es la falta de implementación de algún sistema de inocuidad, o medidas preventivas para asegurar la inocuidad del producto como el SSRC, esto aunado a las características propias de la fresa y su manejo postcosecha, pueden dar lugar a contaminación en el fruto y posiblemente brotes asociados a éste. Sin embargo, aún no existe información respecto a la calidad microbiológica de la fresa producida en el valle de Culiacán.

2.6.2 Descripción de la Zona de Estudio

El estado de Sinaloa destaca a nivel nacional por su elevada producción agrícola, principalmente de granos y hortalizas; así mismo, otro tipo de cultivo en el que se destaca es en la producción de bayas o frutos rojos, principalmente arándano y fresa (SIAP, 2018). La región del valle de Culiacán es irrigada con agua proveniente de las presas Adolfo López Mateos y Sanalona, de las cuales derivan los ríos Humaya y Tamazula, respectivamente. Estos ríos convergen en la zona urbana de Culiacán, dando origen al río Culiacán y la derivación a partir de este río en un sistema de canales que distribuyen el agua en los municipios de Culiacán y Navolato, principalmente. De acuerdo con información del Sistema de Información Agrícola y Pesquera (SIAP-SADER), Sinaloa se ubica como el décimo estado productor de bayas, con una superficie sembrada de 30 hectáreas y una producción de 10 toneladas por hectárea (SIAP, 2019). Mediante una investigación de campo y una revisión en las bases de datos de dependencias como CESAVESIN se ha podido comprobar que en el valle de Culiacán se cultiva una mayor superficie de fresa que la reportada. Existen productores de fresa, con superficies cultivadas que varían de 1 hectárea hasta 2 o más hectáreas. Estos cultivos se encuentran ubicados a no más de 5 kilómetros del centro urbano de la ciudad de Culiacán y cercanos a los márgenes del río Culiacán y los canales de riego que de este derivan.

Las actividades culturales de los productores de fresa ubicados en el valle de Culiacán, como la irrigación, recolección y manejo agronómico de cultivo son muy similares. La principal diferencia que se observa es el agua utilizada para irrigación, ya que algunos productores utilizan agua extraída de pozo y otros, agua de canal, siendo esta última la utilizada por el mayor número de productores en la región. Considerando lo anterior, y con los antecedentes de la presencia de patógenos en el agua superficial, se optó por analizar un plantío que utiliza agua de canal para la irrigación. El plantío se ubica a las afueras de la zona urbana de Culiacán, coordenadas: 24°47'10.9"N 107°29'26.4"W; cuenta con una superficie de dos hectáreas y se utiliza un sistema de riego por goteo. La cosecha del fruto se da de forma manual por 10 trabajadores, quienes seleccionan el fruto maduro y lo recolectan en cubetas, una vez llenas, vacían su contenido en jabas de plástico las cuales son distribuidas a los diferentes puntos de venta, que se encuentran a nomas de 10 kilómetros a la redonda del plantío. En este plantío en específico no se siguen lineamientos de algún sistema de producción basado en buenas prácticas de manufactura, esto se observó durante la toma de muestra y se confirmó por comunicación directa con los responsables del plantío.



Figura 5. (24°47'22.8"N 107°29'21.7"W) Ubicación del plantío donde se realizó la toma de muestras de la presente investigación.

2.6.3. Calidad Microbiológica de la Fresa

Los sistemas de producción de fresa varían a nivel global, de manera general se pueden distinguir dos niveles, la producción local o doméstica que principalmente se caracteriza por abarcar pequeñas superficies de cultivo y el empleo de prácticas de producción sencilla, cuyos productos son destinados al mercado local. Por otro lado, existen sistemas de producción a gran escala que se apegan a los más altos estándares de producción y sofisticación de instalaciones. Como resultado de la práctica de estos diferentes niveles de producción la calidad microbiológica de la fresa varía ampliamente.

Durante la producción primaria de fresa existen factores que pueden influir en la calidad microbiológica del fruto, de acuerdo con Uitendale y colaboradores (2015), la distribución de microorganismos en el fruto de fresa está en función de factores como la radiación solar, la temporada de cultivo, aplicación de plaguicidas foliares, el ciclo de cultivo, la precipitación, así como la distribución de los microorganismos en el agua de irrigación, aunado a factores como superficies de contacto y manipulación durante la cosecha.

Un estudio realizado por Delbeke (2015) en 6 plantíos que utilizaban diferentes sistemas de producción de fresa en Europa, demostró la presencia de *E. coli* en agua de irrigación y superficies de contacto, así mismo, demostraron que la concentración de *E. coli* genérica en agua de irrigación es el principal factor de riesgo para la presencia de *E. coli* patógena.

En el caso del fruto que se encuentra en venta, Kurtböke y colaboradores (2016), analizaron la presencia de bacterias entéricas en 109 muestras de fresa en la región costera de Queensland Australia. En este estudio, las muestras se clasificaron en tres categorías de acuerdo con su manejo durante el cultivo, considerando la utilización de fertilizantes orgánicos y la aspersion de plaguicidas químicos. El 63 % de las fresas cultivadas con fertilizante orgánico (8/13) mostró presencia de enterobacterias; en el caso de 93 muestras cultivadas sin fertilizantes orgánicos y tratadas con aspersion de plaguicidas se demostró la presencia de enterobacterias en el 13 % de éstas. Por otro lado, las 3 muestras analizadas cuyo manejo consistió en no utilizar fertilizante orgánico y tampoco plaguicidas químicos presentaron bacterias entéricas. Los principales géneros encontrados fueron *Escherichia*, *Enterobacter*, *Raoultella*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Shigella*, *Citrobacter* y *Cronobacter*. Estos autores señalan que la presencia de potenciales patógenos

pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* en fruto cultivado sin fertilizante orgánico y tratado con aspersión de plaguicidas constituye un riesgo para la salud del consumidor (Kurtböke *et al.*, 2016).

2.7. Caracterización Genotípica de Enterobacterias

Las tecnologías de secuenciación de nueva generación han revolucionado el campo de la genómica, permitiendo la secuenciación de un gran número de genomas en muy poco tiempo. El genoma brinda, en principio, el catálogo completo de genes que un organismo puede expresar, pero la interpretación de esta información a todos los niveles (desde el enorme volumen de datos crudos originados por el secuenciador hasta los miles de genes identificados en paralelo asociados a diversas funciones) constituye un gran reto desde el punto de vista computacional. El ensamblaje *de novo* es uno de los procedimientos empleados para reconstruir genomas, principalmente bacterianos (Aguilar-Bultet y Falquet, 2015). Después del ensamblaje del genoma, el próximo paso consiste en interpretar la información que contiene. Para ello, es necesaria la identificación de las principales características del genoma, proceso conocido como anotación. La anotación de genomas comprende dos etapas fundamentales: la anotación estructural (predicción de regiones codificantes) y la anotación funcional (asignación de información biológica a los genes previamente predichos) (Christoffels - Van Heusen, 2019).

Los métodos para la anotación estructural en un genoma se dividen en dos categorías: método “*de novo*”, y método por comparación (Harrow *et al.*, 2009). El método *de novo* utiliza algoritmos estadísticos o de reconocimiento de patrones para determinar si la secuencia de interés es codificante o no, mediante la detección de patrones o motivos específicos en la secuencia. Por otro lado, el método por comparación identifica zonas de alta similitud en organismos relacionados o en bases de datos de proteínas para reconocer las regiones codificantes. Sin embargo, este método es menos exitoso en la identificación de nuevos genes y en nuevos organismos, ya que las bases de datos están sesgadas hacia los genes altamente expresados en los organismos más estudiados (Aguilar-Bultet y Falquet, 2015).

Como población, las cepas de *E. coli* pueden ser asignadas filogenéticamente a 5 grupos principales

A, B1, B2, D y E, incluyendo *Shigella* en diferentes grupos. los aislados de *E. coli* genéricas se agrupan principalmente en el filogrupo A, sin embargo, no todos los patotipos de *E. coli* se agrupan (Touchon *et al.*, 2009).

El tamaño promedio de los genomas de *E. coli* se encuentra alrededor de 5.13 mega bases (Mb), un contenido de proteínas de alrededor de 4700 y un contenido Guanina-Citocina (% GC) de 50-51 % (Kass *et al.*, 2012). El genoma puede diferir por un millón de pares de bases entre cepas genéricas y cepas patógenas, la longitud media del genoma este contenido genético extra puede contener genes de virulencia y de adaptación. Estudios de genómica comparativa han demostrado que el genoma de *E. coli* está compuesto por el genoma “core” y el genoma “accesorio”. Una comparación reciente de 186 genomas de *E. coli* encontró alrededor de 17,00 genes homólogos en todos los genomas y un pangenoma de 16,400 grupos de genes (Kass *et al.*, 2012).

El ADN puede intercambiarse entre hospederos procariontas a través de mecanismos como la conjugación, transformación y transducción, codificados por elementos genéticos móviles, resultando en transferencia horizontal de genes. Los elementos móviles como transposones, secuencias de inserción (transformación), bacteriófagos (transducción) y plásmidos (conjugación) pueden existir integrados en el cromosoma o a través de la replicación dentro del nuevo hospedero para proporcionar nuevas características y ventajas. Los factores de virulencia mejor definidos dentro de cepas patogénicas de *E. coli* son derivados de elementos genéticos móviles. Por ejemplo, la mayoría de los genes de toxinas y factores de colonización requeridos para la patogénesis de ETEC se encuentran exclusivamente en plásmidos, mientras que en EPEC y algunas STEC, las cepas comparten un grupo de genes de virulencia de 35 kb en una isla de patogenicidad del cromosoma, llamado el locus de eliminación de enterocitos (LEE) el cual es requerido para la unión y destrucción de las células hospederas como parte de la virulencia de este patotipo (Qadri *et al.*, 2005; McDanie *et al.*, 1995). Es importante mencionar que los genes que codifican factores de virulencia (cuando el hospedero es humano), como el locus de eliminación de enterocitos o toxinas shiga, contribuyen a la supervivencia en el ambiente o durante el comensalismo en otros hospederos y proveen un factor adaptativo para la retención de ciertas características (Tenailon *et al.*, 2010).

La secuenciación del genoma completo (WGS, por sus siglas en inglés) ha aclarado que una proporción sustancial de los aislados identificados como *K. pneumoniae* mediante ensayos bioquímicos o proteómicos en laboratorios clínicos y de investigación pertenecen en realidad a especies estrechamente relacionadas que comparten una identidad nucleotídica media del 95-96 %

con *K. pneumoniae*. Este grupo no tiene una designación taxonómica formal, pero se refiere a este como complejo de especies de *K. pneumoniae* (KpSC, siglas en inglés), señalando que sus miembros comparten solo el 90 % de identidad de nucleótidos promedio con otras especies de *Klebsiella* (Figura 6). Entre las KpSC *K. pneumoniae* “sensu stricto” es muy prevalente en muestras clínicas, y por lo general comprende ~ 85 % de las cepas identificadas como *K. pneumoniae*.

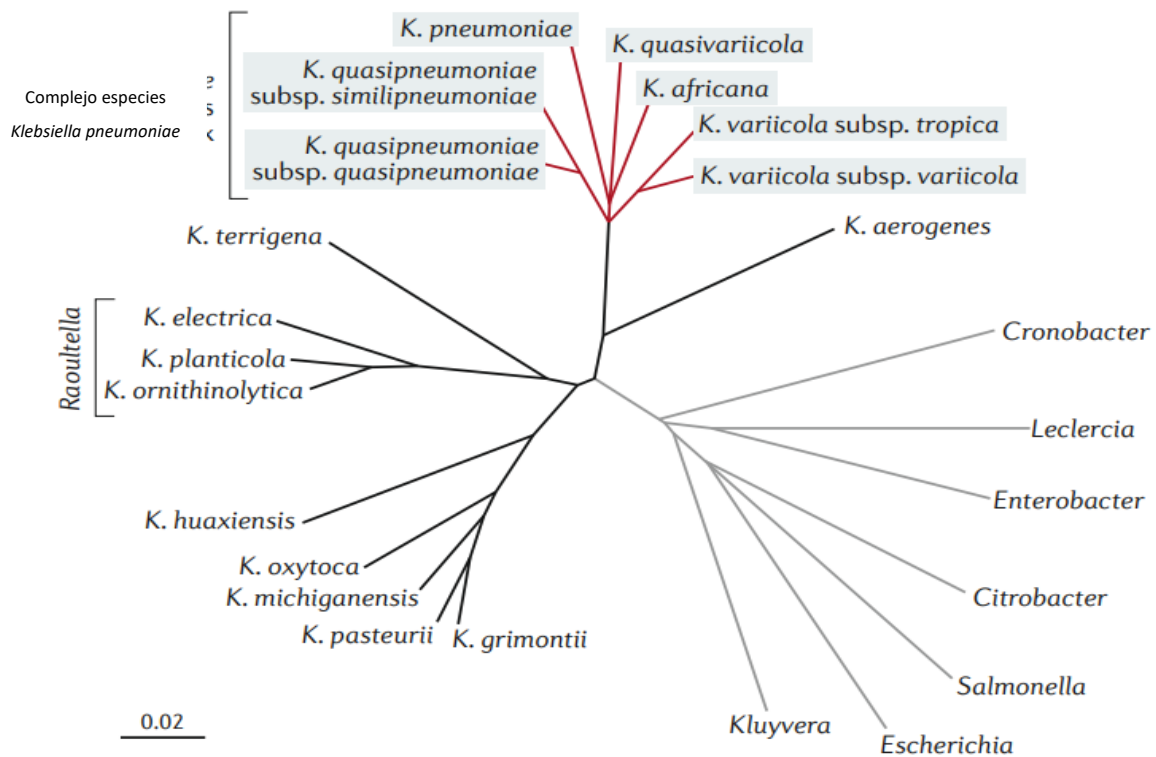


Figura 6. Posición taxonómica de *K. pneumoniae*. Árbol filogenético basado en genomas completos. Se muestra la relación entre *K. pneumoniae*, sus especies más cercanas en el complejo de especies de *Klebsiella pneumoniae* (ramas rojas), otros miembros del género *Klebsiella* (ramas negras) y de la familia *Enterobacteriaceae* (ramas grises). Tomado de Wyres *et al.*, 2020.

3. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

- Existe presencia de bacterias Coliformes por lo menos en el 23 % de muestras analizadas en la cadena de producción de fresa en Culiacán, Sinaloa.
- Los aislado de coliformes presentes en muestras de campo persisten a lo largo de la cadena de producción de fresa en Culiacán.
- Los aislados de Coliformes presentes en la cadena de producción de fresa presentan genes de virulencia y genes de resistencia a antibióticos por lo que pueden considerarse patógenos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

- Determinar de manera bioinformática el potencial patogénico y caracterizar el fenotipo de resistencia a antibióticos de las coliformes presentes en la cadena de producción de fresa cultivada en Culiacán, Sinaloa.

4.2. Objetivos Específicos

- Aislar Coliformes totales, Coliformes fecales y *E. coli* presentes en la cadena de producción de fresa en Culiacán, Sinaloa.
 - Evaluar el perfil de resistencia a antibióticos de los aislados bacterianos presentes en la cadena de producción de fresa.
 - Caracterizar el contenido genético relacionado con la virulencia de los aislados presentes en la cadena de producción de fresa.
 - Determinar la relación filogenética entre los aislados bacterianos presentes en las diferentes matrices analizadas de la cadena de producción de fresa.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria (LANIIA) del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, Coordinación Culiacán. La metodología se dividió en dos etapas, la primera consistió en la cuantificación de microorganismos indicadores de contaminación fecal (Coliformes totales, fecales y *E. coli*) en muestras de agua de irrigación, fruto precosecha y fruto en el punto de venta, superficies de trabajo y manos de trabajadores durante la cadena de producción de fresa. Se seleccionaron cepas bacterianas para la evaluación de resistencia a antibióticos utilizando la prueba de difusión en disco. La siguiente etapa consistió en la caracterización genómica de los aislados. Para esto se realizó la secuenciación de genoma completo, posteriormente, mediante análisis bioinformáticos se realizó la búsqueda de factores de virulencia, genes de resistencia a antibióticos, la construcción del pangenoma y árboles filogenéticos.

5.1 Toma de Muestras

La toma de muestras se llevó a cabo durante en los meses de febrero y marzo de 2020 que están dentro del periodo de mayor producción de fresa, el cual abarca los meses de marzo, abril y mayo. Se realizaron 5 tomas de muestras durante las etapas de cosecha y comercialización de fresa. Como muestras, estas se clasificaron en 5 matrices diferentes incluyendo: agua de irrigación, fruto precosecha, manos de los trabajadores, superficies de contacto durante la cosecha y fruto empacado en el punto de venta, tomando un total de 25 muestras para su análisis microbiológico.

El agua de irrigación proveniente de canal se recolectó aproximadamente a 30 cm por debajo la superficie, utilizando bolsas Whirl-Pak S-19793 estériles con 450 mL de capacidad, previamente etiquetadas. Las muestras fueron transportadas en hieleras a 4 °C al Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria (LANIIA) del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Unidad Culiacán y fueron procesadas en un periodo no mayor de 6 h.

Las fresas precosecha fueron recolectadas utilizando guantes estériles. Se tomaron frutos maduros directamente de la planta y se depositaron en bolsas de plástico estériles. Posteriormente, las

muestras se colocaron en hieleras a 4 °C y se trasladaron al LANIIA-CIAD, para ser procesadas dentro de las primeras 24 h después de su recolección.

Para la toma de muestra de manos y superficies se utilizaron esponjas estériles (Whirl-Pak, Speci-Sponge), previamente hidratadas con 10 mL de agua peptonada tamponada. Una vez que las manos y superficies eran frotadas en su totalidad, la esponja se depositó en su respectiva bolsa plástica y se almacenó en hielera a 4 °C para su traslado al LANIIA para ser procesadas dentro de las primeras 24 h después de su recolección.

Para la muestra en el punto de venta, se acudió a uno de los puntos de venta donde se distribuye la fresa proveniente del plantío en estudio y se compró una unidad del producto en venta; en este caso, los frutos necesarios para llenar un recipiente con un volumen de 1 litro. La fresa se depositó en bolsas plásticas y se mantuvo a 4 °C en hielera para su traslado al LANIIA, para ser procesadas dentro de las primeras 24 h después de su recolección.

5.2. Cuantificación de Coliformes Totales, Fecales y *E. coli*

Las muestras de agua superficial fueron analizadas siguiendo la Norma NMX-AA-042-SCFI-2015; las muestras de manos, superficies y frutos se analizaron siguiendo la NOM-210-SSA1-2014, *Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos*. La cual está descrita en el apéndice H normativo, Método aprobado para la estimación de la densidad de coliformes totales, fecales y *E. coli* por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua (DOF, 2015).

Para la cuantificación de Coliformes totales, fecales y *E. coli* en los diferentes tipos de muestra se utilizó la técnica de Número Más Probable (NMP), siguiendo la metodología descrita en la norma NOM-210-SSA1-2014. De manera general, el procesamiento de la muestra consistió en realizar diluciones seriadas en caldo lauril triptosa (BD Difco™, EUA) e incubación de 24 a 48 h a 36 °C. Transcurrida la incubación, se realizó un conteo de los tubos que presentaron turbidez y producción de gas en los tubos Durham, éstos fueron considerados para el cálculo de NMP de Coliformes totales. Posteriormente, se tomó una asada de los tubos que presentaron crecimiento y se inocularon en tubos de caldo EC (BD Difco™ EUA), incubando de 24 a 48 h a 44.5 °C, de presentarse

crecimiento después de transcurrido el tiempo de incubación, se consideró el número de tubos positivos para el cálculo de Numero Más Probable de Coliformes fecales. De cada tubo que presentó turbidez y producción de gas se tomó una asada y se estrió en agar EMB-L (BD Difco™ EUA) en búsqueda de colonias características de *E. coli* (colonias verdes con o sin brillo metálico), de las cuales se seleccionó una colonia para realizar pruebas bioquímicas de indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer y citrato de Simmons (INVC). para el cálculo de NMP de *E. coli* se consideraron los tubos que presentaron colonias confirmadas por las pruebas bioquímicas. Por otro lado, las colonias no características de *E. coli* presentes en agar EMB-L (colonias rosadas sin brillo metálico) fueron analizadas por pruebas bioquímicas y se conservaron para su posterior caracterización. Una vez purificados los aislados de *E. coli* y coliformes fecales estos fueron preservados para posteriormente extraer ADN y realizar la secuenciación de genomas completo. Dado que en esta investigación se busca determinar si los aislados presentes en la cadena de manejo de la fresa pasan al fruto en venta, los aislados a secuenciar serán aquellos que sean encontrados durante el mismo muestreo en cualquiera de las matrices analizadas. pese a que es posible obtener más de un aislado por muestra, por cuestiones de recursos solo se secuenciará un aislado por matriz.

5.3 Prueba fenotípica de Susceptibilidad a Antibióticos

Se evaluó la resistencia a antibióticos de las cepas seleccionadas para secuenciación. Para esto se utilizó la técnica de difusión en disco (Kirby-Bauer) siguiendo las recomendaciones del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, siglas en inglés). En total se evaluaron 12 antibióticos (cuadro 1) contra las 5 cepas secuenciadas y se utilizó como control de calidad interno a *E. coli* ATCC 25922 (CLSI, 2017).

Cuadro 1. Antibióticos utilizados para la evaluación de resistencia en enterobacterias.

Antibiótico	Concentración	Susceptible	Intermedio	Resistente
Cefepime	30 µg	> 25	19-24	<18
Tobramicina	10 µg	>15	13-14	<12
Cloranfenicol	30 µg	>18	13-17	<12
Ampicilina/sulfátame	10/10 µg	>15	12-14	<11

Cefazolin	30 µg	>23	20-22	<19
Cefuroxime	30 µg	>23	15-22	<14
Cefotetan	30 µg	>16	13-15	<12
Ampicilina	10 µg	>17	13-16	<13
Amikacina	30 µg	>17	15-16	<14
Ciprofloxacino	5 µg	>21	16-20	<15
Tetraciclina	30 µg	>15	12-14	<11
Cefoxitina	30 µg	>18	15-17	<14

5.4 Secuenciación, Ensamble y Anotación de Genomas de Aislados en la Producción de Fresa

Una vez analizadas las colonias características y no características de *E. coli*, éstas fueron preparadas para ser secuenciadas. Primero se cultivaron en agar soya tripticaseína (TSA) por un periodo de incubación de 24 horas a 36 °C. Con un asa estéril se tomó una asada y se inoculó en agua peptonada para obtener una concentración aproximada de 1×10^5 UFC/mL y realizar la extracción de DNA genómico. La extracción de ADN se realizó utilizando el kit DNeasy blood and tissue kit (Qiagen, Alemania) siguiendo las especificaciones del fabricante. Una vez realizada la extracción, se verificó la integridad del ADN realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1%, y se cuantificó utilizando el equipo NanoDrop 2000c (Thermo Scientific™, EUA). Se seleccionaron las extracciones donde se obtuvieron concentraciones mayores a 20 ng/microlitro y pureza 1.8-2.0 A260/280 y 1.8-2.2 A260/230. Las muestras de ADN fueron enviadas a CIAD Mazatlán, al Laboratorio de Genómica Microbiana para su secuenciación donde se utilizó el equipo MiniSeq (Illumina, EUA).

Una vez obtenidas las secuencias, éstas fueron ensambladas utilizando el software SPAdes v3.0, se optó por utilizar este software ya que fue el que generó mejores parámetros de salida, como menor número de contigs, menor N50 y mayor L50. Una vez ensambladas las secuencias, éstas fueron depositadas en la base de datos PATRICBRC (Pathosystems Resource Integration Center, Bioinformatics Resource Center) para su anotación, utilizando la herramienta de anotación RAST; (Davis *et al.*, 2020; Brettin *et al.*, 2015). Así mismo se utilizó BLAST (basic local alignment search tool) para hacer una aproximación taxonómica de los aislados y se confirmó mediante el ANI (average nucleotide identity). El criterio establecido para la demarcación de especie es >98% identidad de nucleótidos ((Eren *et al.*, 2015; Delmont y Eren, 2018).

5.4.1 Caracterización de Genes de Resistencia a Antibióticos y Genes de Virulencia

Una vez anotadas las secuencias en la plataforma PATRICBRC, éstas fueron analizadas en búsqueda de genes de resistencia a antibióticos y los principales genes de virulencia, tanto en los genomas de *E. coli* como de *Klebsiella*. Dentro de la base de datos PATRICBRC se cuantificaron los genes asociados a factores de virulencia y resistencia a antibióticos, los cuales se denominan genes de especialidad. Para esto, se realizó una búsqueda en las principales bases de datos enfocadas a estos genes, como CARD (The comprehensive antibiotic resistance database) NDARO, VICTOR, entre otras. Esto permitió conocer el número de genes presentes en el genoma, de acuerdo con las principales bases de datos enfocados en estos genes. Así mismo, se utilizaron los servicios bioinformáticos disponibles en el servidor de Centro de Epidemiología Genómica (CGE, siglas en inglés).

Dentro de los servicios utilizados se encuentran ResFinder v4.0, para la identificación de genes de resistencia a antibióticos y el posible fenotipo de resistencia que puede presentar este genoma. La predicción del fenotipo de resistencia a antibióticos con base en la información genómica de un aislado es de gran utilidad, en el caso de la plataforma CGE, a través de la herramienta ResFinder v4.0 recopila información de los fenotipos de resistencia de genomas reportados, también realiza una predicción de fenotipo de resistencia basado en herramientas de aprendizaje automático, con las cuales realiza un análisis del contenido del contenido de genes asociados con resistencia y se arroja como resultado a cuál de los antibióticos existentes podría generar resistencia la presencia de estos genes.

Una de las herramientas del servidor CGE permite conocer si los genomas presentan plásmidos. PlasmidFinder permite comparar secuencias de replicones que coinciden con al menos un 80 % de identidad de nucleótidos con todas las secuencias de replicones identificadas en 559 plásmidos completamente secuenciados (Carattoli *et al.*, 2015).

PathogenFinder es una herramienta que permite asignar una probabilidad de la patogenicidad de la bacteria teniendo al humano como hospedero, esto en cuanto a características genotípicas, para esto compara grupos de proteínas presentes en la secuencia analizada con bases de datos existentes. También se utilizó SeroTypeFinder para la determinación del serotipo de los aislados de *E. coli* y PlasmidFinder para detectar los plásmidos presentes en cada genoma.

5.5 Determinación del Pangenoma y Análisis Filogenómico de Cepas de *E. coli* y *Klebsiella*

Durante este estudio se aislaron cepas provenientes de diferentes matrices. Los genomas secuenciados se obtuvieron durante el mismo muestreo por lo que se realizó un análisis filogenético para las cepas de *E. coli* y *Klebsiella*, esto con la intención de evaluar la similitud entre las cepas obtenidas en este estudio; así mismo, se compararon con cepas de otras regiones del mundo provenientes de matrices similares como muestras ambientales y con aislados clínicos. Para este análisis se utilizó la plataforma anvio v6.2, con la cual se buscó visualizar el genoma core, el genoma accesorio y los genes únicos de cada cepa, así como el porcentaje de identidad que comparten entre ellas. Una vez que se determinó el genoma core de ambos grupos se seleccionaron los genes de una sola copia que presentaban mejores características para realizar el análisis filogenómico. Se concatenaron los genes y se construyó el árbol mediante el programa PHYML v2.2.3 (Eren *et al.*, 2015; Delmont y Eren, 2018).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Cuantificación de Coliformes Totales, Fecales y *E. coli*

En total se realizaron 5 muestreos, en cada uno de los cuales se tomaron muestras de agua de irrigación, fresas en etapa precosecha, manos de cosechadores, superficies de contacto durante la cosecha, y fruto en punto de venta para un total de 25 muestras analizadas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Concentraciones de bacterias Coliformes totales y Coliformes fecales obtenidas en los diferentes tipos de muestra..

Número de muestreo	Muestra	Clave	Coliformes totales (NMP/100 mL)	Coliformes fecales (NMP/100 mL)	<i>E. coli</i>
1	Agua de irrigación	A	2.4E+5	2.4E+5	1,500
	Fresa precosecha	Fp	<3	<3	<3
	Manos	M	150	43	<3
	Cubeta	C	1,100	1,100	<3
	Fresa-venta	Fv	1,100	3	<3
2	Agua de irrigación	A	2.4E+5	2.4E+5	1,501
	Fresa precosecha	Fp	<3	<3	<3
	Manos	M	<3	<3	<3
	Cubeta	C	11,000	230	<3
	Fresa-venta	Fv	9.1	<3	<3
3	Agua de irrigación	A	2.4E+5	2.4E+5	2.4E+5
	Fresa precosecha	Fp	240	<3	<3
	Manos	M	<3	<3	<3
	Cubeta	C	<3	<3	<3
	Fresa-venta	Fv	<3	<3	<3
4	Agua de irrigación	A	2.4E+5	1.10E+5	1.10E+5
	Fresa precosecha	Fp	23	<3	<3
	Manos	M	1,100	1,100	*
	Cubeta	C	2.4E+5	2.4E+4	<3
	Fresa-venta	Fv	1,100	240	*
5	Agua de irrigación	A	1.5E+5	4,300	2,300
	Fresa precosecha	Fp	<3	<3	<3
	Manos	M	<3	<3	<3
	Cubeta	C	1.1000	23	<3
	Fresa-venta	Fv	43	3.6	<3

Agua de irrigación (NMP/100 mL) Fruto (NMP/g), manos y cubeta (NMP/cubeta-par de manos).

6.1.1. Agua de Irrigación

Las muestras de agua de irrigación (5) fueron las que presentaron mayor contaminación por Coliformes Totales, Fecales y *E. coli*. Se cuantificaron valores máximos y mínimos entre 1.1×10^5 y 2.4×10^4 NMP/100mL tanto en Coliformes totales y fecales. En el caso de *E. coli* se encontraron valores entre 1,500 y 1.1×10^5 . Estos valores son similares a los reportados por CONAGUA en su informe de calidad del agua de años anteriores (2017-2019) en agua superficial, donde la mayoría de los puntos de monitoreo se encuentran fuertemente contaminados, es decir, presentan una concentración mayor que 10,000 NMP/100 mL. La alta contaminación del agua puede atribuirse a que el flujo de agua recibe descargas constantes de materia fecal debido a la presencia de ganado en las poblaciones cercanas a los ríos, así como las descargas que se reciben de la zona urbana, como heces de animales y descargas por el sistema de drenaje de la ciudad.

6.1.2. Fruto Precosecha

El tipo de muestra que menor contaminación presentó fue el fruto precosecha, en los que sólo se detectaron concentraciones de 23 a 240 NMP/g de coliformes totales. Para el caso de coliformes fecales y *E. coli*, no se detectaron. Las bajas concentraciones pueden ser atribuidas a que en el lote se utiliza riego por goteo, el cual, es el tipo de riego que menor riesgo de contaminación genera; además, los surcos cuentan con plástico protector que evita que los frutos estén en contacto directo con el suelo (Rock *et al.*, 2019). En el caso del plantío analizado, en este se realizaba de manera constante la aplicación de plaguicidas de manera foliar. Para la preparación de las mezclas se utilizaba la misma agua de irrigación, en este caso pese a las altas concentraciones de CT y CF en el agua de irrigación, estas no se presentaron en el fruto. Una posible causa de este fenómeno puede ser debido al mecanismo de acción del plaguicida, el cual también puede tener un efecto bactericida sobre las poblaciones de bacterias en el fruto. De acuerdo con Uyttendaele y colaboradores (2015), la concentración de microorganismos en el cultivo de fresa depende, además de la distribución regional de microorganismos en el agua de irrigación, de algunos factores como la radiación solar, el ciclo del cultivo, la temporalidad, las lluvias y el tipo de riego.

6.1.3. Superficie de Recipientes

Las muestras de superficie de los recipientes utilizados en la cosecha mostraron altas concentraciones de microorganismos indicadores CT y CF. El 80 % de muestras analizadas (4/5) presentaron contaminación por coliformes totales y fecales con concentraciones de 1,100 a 1.1×10^4 NMP/cubeta para el caso de coliformes totales y de 23 a 2,400 NMP/cubeta en el caso de coliformes fecales. En el caso de *E. coli*, se encontraron concentraciones de 15 a 900 NMP/cubeta en 3 de las 5 muestras analizadas. Sólo una muestra no presentó concentraciones detectables de coliformes fecales y *E. coli*. Esta variación en la concentración de coliformes y *E. coli* puede estar estrechamente relacionada con el manejo de los recipientes utilizados, entendiendo como manejo el lavado, almacenamiento, organización de estos. En el plantío donde se tomaron las muestras no se realiza un adecuado lavado y desinfección de estos recipientes durante la cosecha. La única fuente de agua en el plantío es el agua de irrigación, la cual proviene de un canal de riego, por lo que es muy probable que esta agua sea utilizada para lavar los recipientes.

6.1.4. Manos Durante la Cosecha

De las 5 muestras de manos analizadas únicamente 2 presentaron concentraciones de coliformes. Durante el primer muestreo se detectó una concentración de 150 NMP/par de manos de coliformes totales y 43 NMP/par de manos de coliformes fecales. La muestra de manos correspondiente al cuarto muestreo presentó una concentración de 1,100 NMP/par de manos, tanto de coliformes totales y fecales. Los análisis genómicos posteriores realizados a estos aislados demostraron la presencia de *Klebsiella pneumoniae* con una concentración de 21 NMP/par de manos durante el cuarto muestreo. Esta variabilidad puede ser atribuida a cada trabajador, ya que en el plantío analizado no se sigue ningún protocolo para el correcto lavado de manos de los trabajadores, además no se tiene establecido la utilización o no de guantes durante la cosecha.

6.1.5. Fruto en Punto de Venta

Del total de muestras analizadas de fruto en punto de venta, se detectaron coliformes totales en cuatro de estas, durante los muestreos 1, 2, 4 y 5, con valores de 1,100, 9.6, 1,100 y 43 NMP/g respectivamente. En el caso de coliformes fecales sólo se detectaron durante los muestreos 4 y 5 con valores de 240 y 3.6 NMP/g, respectivamente. Solo en la muestra correspondiente al 4º muestreo identificada como fv4 se obtuvieron aislados en medio EMB-L como parte de la confirmación de *E. coli*. Estos aislados no presentaban la morfología colonial característica de *E. coli*, que, de acuerdo con las especificaciones del medio de cultivo, son colonias de color verde con brillo metálico. Estas presentaron color rosa pálido y un tamaño mayor, aun así, se continuó con la preservación de estas para su posterior identificación como *Klebsiella quasipneumoniae*, esto, mediante la secuenciación de genoma completo de uno de los aislados. Considerando la presencia de estas colonias en las placas de EMB-L se pudo estimar una concentración de 93 NMP/g. Durante el cuarto muestreo, también se detectó la presencia de Coliformes totales y fecales en manos de trabajadores y se detectaron las concentraciones más altas de Coliformes y *E. coli* en cubetas. Así mismo, las concentraciones de coliformes totales y fecales en el fruto a la venta son mayores a las encontradas en el fruto precosecha. Este aumento puede ser atribuido a la contaminación existente en las manos de los trabajadores y las superficies con las que está en contacto el fruto al ser cosechado, ya que una vez desprendido de la planta, se coloca en cubetas, posteriormente en jabas y enseguida es transportado al punto de venta donde también otra persona se encarga del empaque del fruto. Este procedimiento consiste en llenar recipientes de 1 litro de capacidad, y se realiza de manera manual. Cabe señalar que estos recipientes son reutilizados, por lo que pueden acumular polvo y materia orgánica desprendida de frutos dañados. Con la realización de esta investigación no fue posible obtener datos suficientes para hacer un modelo estadístico para conocer cómo contribuyen la contaminación de las superficies y manos de los trabajadores en la concentración de microorganismos en el fruto en punto de venta. Un estudio realizado por Njage y colaboradores (2017), demostró que, en 5 compañías dedicadas al procesamiento y exportación de productos frescos en Kenia, pese a la aplicación de sistemas de manejo de la inocuidad de productos frescos, se presentaron altos niveles de coliformes en el producto final, esto señala la existencia de contaminación cruzada, y deficiencia en la aplicación de las medidas de los sistemas de manejo de

la inocuidad. Este mismo estudio indica que la probabilidad de contaminación del fruto aumenta con el manejo de este mismo, esto al observar niveles de contaminación más altos en el producto final que en el fruto antes del procesamiento (cosecha, empacado) al igual que los resultados observados en el presente estudio. Hasta el momento no hay datos suficientes para hacer un modelo estadístico para conocer cómo contribuyen la contaminación de las superficies y manos de los trabajadores en la concentración de microorganismos en el fruto del punto de venta. Sin embargo, la realización de esta investigación se ha demostrado la presencia de coliformes fecales en manos y frutos, por lo que podría utilizarse como sustento para investigaciones posteriores.

Los resultados obtenidos en las muestras de agua, fruto precosecha, superficies de contacto (cubeta) y manos, refleja la falta de implementación de sistemas de inocuidad en la producción primaria de fresa en la región del valle de Culiacán, ya que en general son pequeños plantíos que se enfocan a la producción para consumo local, esto aunado a la carencia de recursos e infraestructura, y, en mayor medida, al desconocimiento y desinterés por parte de los productores de implementar medidas para asegurar la inocuidad de sus productos. A pesar de que en México se cuenta con esquemas de inocuidad alimentaria sugeridos como el Sistema de Reducción de Riesgos de Contaminación, la implementación de éste se da de manera voluntaria por parte de los productores. Una alternativa de solución a esta problemática podría ser el capacitar o informar a los productores sobre la implementación de estos sistemas, para concientizarlos y que adopten estas prácticas en la producción de fresa; por otra parte, las autoridades locales deberían monitorear la producción de fresa para tener una mejor regulación, con esto se podría lograr un cambio radical en la inocuidad de los alimentos destinados al mercado local.

6.2. Prueba Fenotípica de Susceptibilidad a Antibióticos

La evaluación de resistencia a antibióticos en las cepas seleccionadas demostró que tanto las cepas de *E. coli* como de *Klebsiella* fueron resistentes a ampicilina. En el caso del complejo de especies de *Klebsiella pneumoniae* esta característica es intrínseca, por la presencia del gen *bla shv* en el cromosoma, en algunas especies este gen se denomina *okp*. Este gen se asocia a la producción de beta lactamasas para resistencia a antibióticos beta lactámicos como la ampicilina; así mismo,

pertenece a la familia de genes conocidos como betalactamasas de espectro extendido o ESBL (por sus siglas en inglés), los cuales representan una de las principales familias de genes causantes de resistencia a antibióticos en casos de cepas multirresistentes (Kim *et al.*, 2015; Wyres *et al.*, 2016). En el cuadro 12 se muestra el número de copias de este gen presente en cada genoma, y en la figura 12 se muestra la ruta de producción de betalactamasas y la función de este gen. De acuerdo con el manual del CLSI, para comprobar la presencia de ESBL es necesaria la evaluación de ciertos antibióticos, como Cefuroxima, Ceftazidima, Aztreonam, Cefotaxima y Ceftriaxona; sin embargo, durante este estudio, no se abarcaron estos antibióticos y la base de datos de ResFinder no está actualizada con estos antibióticos.

Los aislados de *E. coli* provenientes de agua de irrigación presentaron resistencia a Cloranfenicol y Tetraciclina. Este resultado es similar al obtenido por Castañeda–Ruelas y colaboradores (2018), donde se evaluaron 111 aislados de *Salmonella*, y el mayor número de cepas fue resistente a Cloranfenicol y Tetraciclina. De acuerdo con la predicción del fenotipo, esta resistencia está mediada por los genes *mdfA*, y *gyrA*, principalmente. Comparando los resultados de estudios anteriores, donde la resistencia se ha presentado en los mismos antibióticos (Cloranfenicol y Tetraciclina), se puede afirmar que la resistencia también está en función de los antibióticos que son utilizados con mayor frecuencia en la región, esto se ha demostrado en estudios como el realizado por Grover y colaboradores (2006) donde analizaron la resistencia a antibióticos durante dos periodos; el primero, previo a la introducción de Cefepime en el mercado, y el segundo, un año después de la comercialización de este antibiótico, donde encontraron que en el segundo periodo un mayor porcentaje de los aislados de *Klebsiella pneumoniae* presentaban mayor resistencia a cefalosporinas después de cierto tiempo.

Cuadro3. Resultados de prueba de resistencia a antibioticos por el metodo de Kirby-Bauer.

Antibiótico	<i>E. coli</i> a4b	<i>E. coli</i> s4b	<i>E. coli</i> a3a	<i>K.</i> <i>pneumoniae</i> m4g	<i>K.</i> <i>quasipneumoniae</i> FV4a
Cefepime	S	S	S	I	I
Tobramicina	S	S	S	S	s
Cloranfenicol	R	S	R	S	S
Ampicilina/sulfátame	R	S	I	S	R
Cefazolin	S	S	R	S	S
Cefuroxime	I	I	I	I	I
Cefotetan	S	S	S	S	S

Ampicilina	R	R	R	R	R
Amikacina	S	S	S	S	S
Ciprofloxacino	I	S	I	I	I
Tetraciclina	R	S	R	S	R
Cefoxitina	S	S	S	S	S

6.3. Secuenciación, Ensamble y Anotación de Genomas

Una vez recibidas las secuencias, éstas fueron ensambladas utilizando el software SPAdes v3.0, y se optó por utilizar este software ya que fue el que mejores parámetros de salida, como menor número de contigs, mayor N50 y menor L50 (cuadro 3).

Cuadro 4. Resultados del ensamble de las secuencias de los aislados utilizando SPAdes v3.0

Parámetro	(A3a)	(A4b)	(Fv4a)	M4g	S4b	A3a
N50	29,742	29,079	148,15	22,230	83,330	41,274
L50	46	47	113	74	20	39
Cobertura	41.9	34.6	15.7	24	69.7	57.7

La anotación de los genomas de los aislados se realizó utilizando el servidor PATRICBRC, el cual se basa en el servidor RAST para la anotación, con el objetivo de determinar el contenido genético relacionado a factores de virulencia y resistencia a antibióticos. Los aislados de muestras de agua de irrigación se identificaron como *E. coli*, al igual que el aislado proveniente de la muestra de superficies de contacto. En el caso del aislado de manos, éste fue identificado como *Klebsiella pneumoniae*, y el aislado de la muestra de fruto en venta se identificó como *Klebsiella quasipneumoniae*. Las características de los genomas, como tamaño y contenido G+C se describen en el cuadro 4. La presencia de estas enterobacterias en la producción de fresa ya se ha reportado por distintos autores a nivel mundial. Delbeke y colaboradores (2015), reportaron la presencia de *E. coli* en el agua de irrigación de distintos sistemas de producción de fresa. Kurtböke y colaboradores (2015), aislaron distintos géneros de enterobacterias (incluidos *Klebsiella* y *E. coli*) en fresa producida en Australia.

Cuadro 5. Datos obtenidos de anotación del genoma utilizando PATRICBCR sobre las características genómicas de *E. coli* y *Klebsiella*.

Fuente	Aislado	Cepa	Genoma	Contenido G+C (%)	Secuencias codificantes
Agua	A3a	<i>E. coli</i>	5,116,214	50.46	5,095
Agua	A4a	<i>E. coli</i>	4,501,580	50.611	4,510
Superficie de contacto	S4b	<i>E. coli</i>	4, 599, 297	50.911	4,468
Manos (cosecha)	M4a	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,496,611	57.348	5,494
Fruto en venta	Fv4a	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i>	5,294,436	58.311	5,356

6.3.1. Anotación del Genoma de *E. coli* A3a

El genoma del aislado A3a (figura 7), fue el que presentó la mayor longitud entre los aislados de *E. coli*, con 5,116,214 pb; así mismo, presentó 5,095 secuencias codificantes, siendo la cepa con la mayor cantidad entre los aislados de *E. coli*. El número de genes asociados a resistencia a antibióticos y blancos farmacológicos existió una variación entre las bases de datos empleadas para este análisis. En el caso de factores de virulencia, la cantidad de éstos podría ser de 233,212 y 92, de acuerdo con “*Victor virulence factors*” (<http://www.phidias.us/victors/intro.php>), PATRIC_VF y VFDB (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>), respectivamente. De acuerdo con la base de datos “*Transporter clasification data base*” (TCDB (<http://www.tcdb.org/>), el genoma presenta 866 genes asociados a transportadores. Respecto a blancos farmacológicos, DrugBank señala que el genoma posee 386 y “*Therapeutic Target Data base*” (<http://db.idrblab.net/ttd/>), que contiene 68. En el caso de genes de resistencia a antibióticos, las bases CARD, PATRICBCR y NDARO señalan 82, 65 y 5 genes de resistencia a antibióticos respectivamente (cuadro 5).

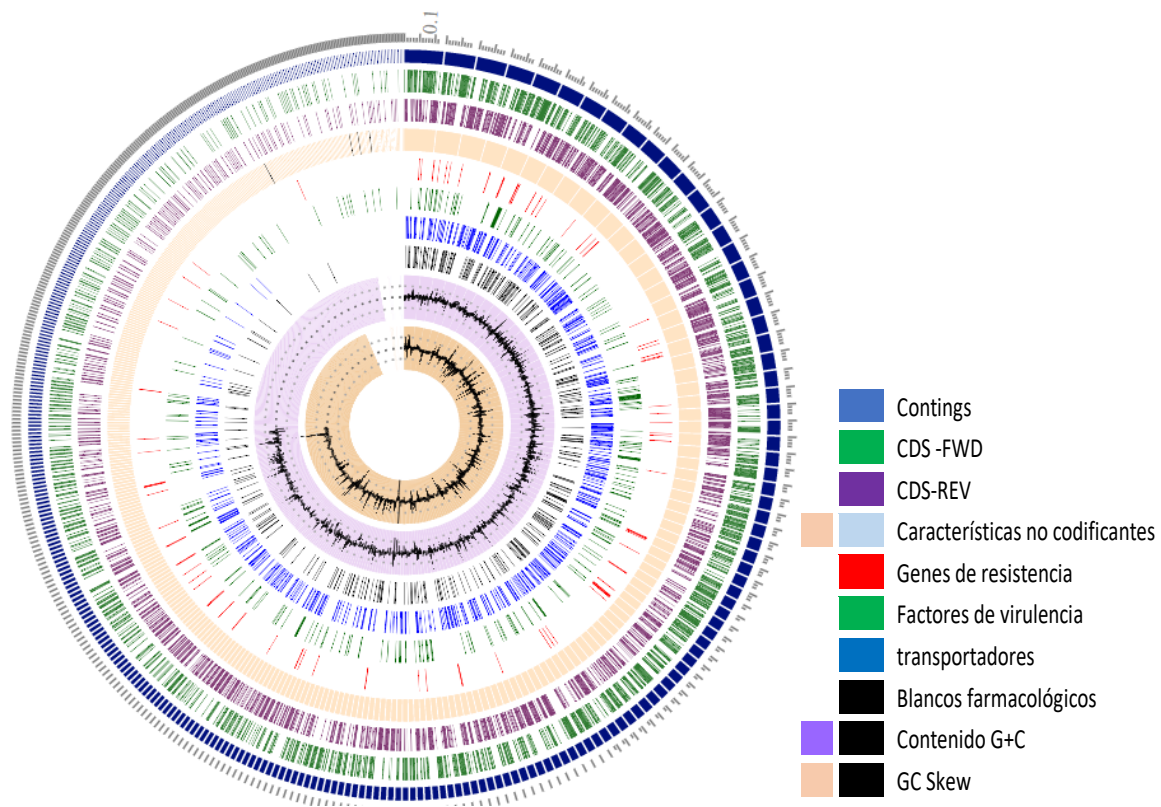


Figura 5. Genoma anotado de *E. coli* A3a con el servidor PATRICBRC. Del lado derecho se señala cada anillo de la figura circular del genoma, siendo el número de contigs el anillo azul exterior y los diferentes grupos de genes de especialidad como resistencia a antibióticos, factores de virulencia, transportadores y blancos farmacológicos, representados en los anillos interiores de color rojo, verde, azul y negro, respectivamente.

Cuadro 6. Contenido de factores de virulencia y genes de resistencia a antibióticos en *E. coli* A3a..

<i>Escherichia coli</i> st. A3a	Fuente	Genes
Factor de virulencia	Victors	233
Factor de virulencia	PATRIC VF	212
Factor de virulencia	VFDB	92
Transportadores	TCDB	866
Blancos farmacológicos	DrugBank	365
Blancos farmacológicos	TTD	58
Resistencia a antibióticos	PATRIC	82
Resistencia a antibióticos	CARD	65
Resistencia a antibióticos	NDARO	5

La herramienta SerotypeFinder permitió determinar el serotipo utilizando la base de datos CGE

(Center For Genomic Epidemiology), la cual señala que podría ser cualquiera de los dos antígenos O O17/O77:H18. Un estudio realizado por Boisen y colaboradores (2020), coloca a aislados con este serotipo en un clado del genogrupo D de *E. coli*. En este caso, los aislados se asocian al patotipo de *E. coli* enteroagregativa, el aislado A3a presenta algunos de los genes que este estudio señala como los mayormente asociados al patotipo de *E. coli* enteroagregativa; sin embargo, menciona que este patotipo, además del contenido genético, está determinado por las características fenotípicas y diferentes serotipos son asociados a este patotipo, por lo que el genoma no es la única forma de clasificarla como enteroagregativa (Boisen et. al, 2020). Utilizando la herramienta SIMILARGENOMEFINFER en PATRICBRC se encontró que el genoma de la cepa PE01_648, proveniente de una muestra de heces aislada en Perú en el año 2018 por Tsukayama y colaboradores mostró la menor distancia genética respecto al aislado A3a (Ondov *et al.*, 2016). Estos genomas tienen una distancia evolutiva de 0.00154 y una similitud de K-meros de 938/1000 (Ondov *et al.*, 2016). Este resultado permite conocer cuál es el genoma reportado hasta el momento que se asemeja a nuestro genoma en estudio. Esto indica que los genomas reportados en la región del valle de Culiacán no son cercanos al genoma de *E. coli* A3a, así mismo el conocer las características de los genomas similares, la fuente de aislamiento y la región geográfica es de utilidad para conocer las posibles implicaciones de la presencia de este aislado.

La cepa PE01_648 fue aislada como parte de un estudio para evaluar la dispersión de genes de resistencia a antibióticos provenientes de cepas de *E. coli* encontradas principalmente en pollo a cepas comensales de las personas (Tsukayama *et al.*, 2021). Esto se demostró al encontrar genes de resistencia a antibióticos utilizados particularmente en la industria avícola como el florfenicol cuyo uso está permitido solo en esta industria avícola, sin embargo, cepas comensales de personas involucradas en la comercialización de pollo presentaron estos genes (Murray *et al.*, 2021).

6.3.2. Anotación del Genoma de *E. coli* A4b

La anotación del genoma del aislado A4b lo identificó como *E. coli*, con un tamaño de genoma de 4,501,580 pb, un contenido G+C de 50.611 % y un total de 4,510 secuencias codificantes (Figura 8). En cuanto a factores de virulencia, este genoma puede contener entre 212 y 59 genes,

dependiendo de la base de datos consultada; de la misma manera, los genes asociados a resistencia a antibióticos que presenta pueden ir de 79 a solamente 4 genes (cuadro 6). Utilizando la herramienta SerotipeFinder se identificó a este aislado como O111:H4. El serotipo O111 se asocia frecuentemente con brotes esporádicos de diarrea. En países desarrollados, el serotipo O111 es uno de los principales serotipos no O157 causantes de infecciones agudas, los principales patotipos que se presentan son enteropatogénico y enterohemorrágico. Aunque el serogrupo O111 de *E. coli* posee cepas patógenas, hay evidencia de que las cepas de este grupo “O”, compuesto de cepas con diversos tipos de antígeno H, muestran una gran variedad de características de virulencia y mecanismos de patogénesis. En el caso de este aislado, no presenta ninguno de los genes mayormente asociados a los patotipos enterohemorrágico y enteropatogénico, como *eaeA*, *bfpA*, *fliC*, *stx* (Alikhani *et al.*, 2011). Utilizando el programa SimilarGenomeFinder de PATRIBRC se encontró que el genoma que presenta mayor similitud a este aislado es el genoma de *Escherichia coli* “strain DLL7531” (Ondov *et al.*, 2016) presentando una distancia de 0.002546 y una cuenta de K-meros de 901/1,000 (Ondov *et al.*, 2016). Este genoma fue aislado en Australia en el año 2015 a partir de una muestra de heces. Este genoma fue aislado y caracterizado en un caso de diarrea asociado antibióticos, (AAD) (Larcombe *et al.*, 2018). El 25 % de los casos de AAD se asocian a *C. difficile* como agente etiológico, sin embargo, en este estudio los casos analizados fueron *C. difficile* negativos. La caracterización de la cepa DLL7531 es del serotipo O11:H4. En el perfil de resistencia a antibióticos se caracterizó como productora de betalactamasas de espectro extendido, por la presencia del gen TEM (Larcombe *et al.*, 2018).

Dentro de los genes de resistencia a antibióticos, este genoma presentó algunos como *catA*, *gyrA*, *tet(B)* y *aadA1*, los cuales podrían proporcionar resistencia a antibióticos de la clase de fluoroquinolonas, aminoglucósidos, tetraciclina y fenicoles.

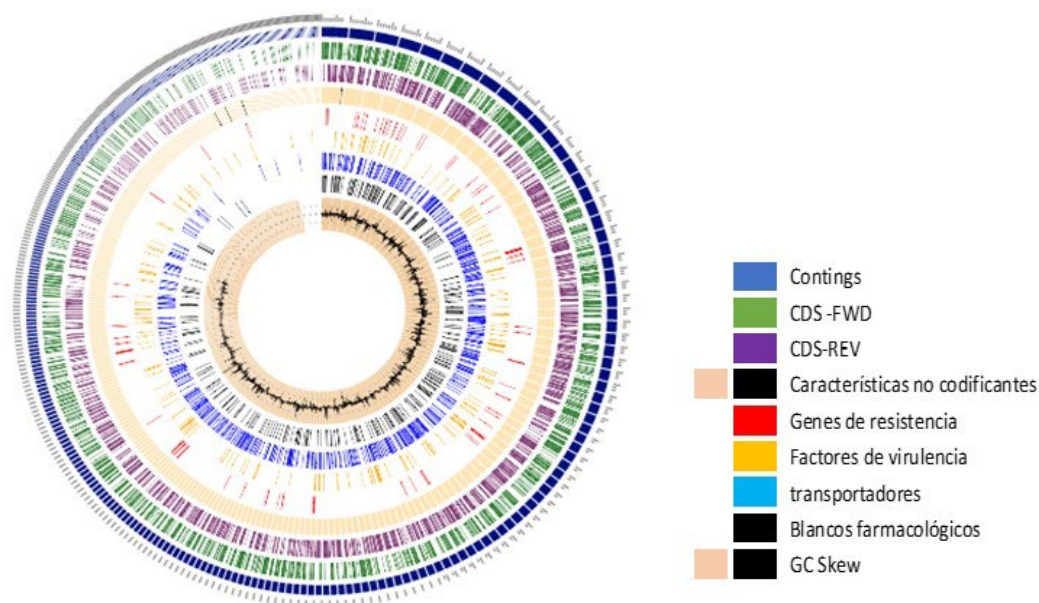


Figura 6. Genoma anotado de *E. coli* A4b con el servidor PATRICBRC. Del lado derecho se señala cada anillo de la figura circular del genoma, que expresa el número de contigs en el anillo azul exterior y los diferentes grupos de genes de especialidad como resistencia a antibióticos, factores de virulencia, transportadores y blancos farmacológicos, representados por los anillos interiores de color rojo, amarillo, azul y negro, respectivamente.

Cuadro 7. Contenido de factores de virulencia y genes de resistencia a antibióticos en *E. coli* A4b.

<i>Escherichia coli</i> st. A4b	Fuente	Genes
Factor de virulencia	Victors	222
Factor de virulencia	PATRIC_VF	212
Factor de virulencia	VFDB	59
Transportadores	TCDB	878
Blancos farmacológicos	DrugBank	385
Blancos farmacológicos	TTD	69
Resistencia a antibióticos	PATRIC	79
Resistencia a antibióticos	CARD	61
Resistencia a antibióticos	NDARO	4

6.3.3. Anotación del Genoma de *E. coli* S4b

La anotación del genoma del aislado S4b, obtenido de superficie de contacto, lo identificó como *Escherichia coli*. Este tiene un tamaño de 4,599, 297 pb, un contenido de G+C de 50.91 % y un

total de 4,468 secuencias codificantes (Figura 9). En cuanto a factores de virulencia, este genoma puede contener entre 221 y 69 genes, dependiendo de la base de datos consultada; de la misma manera, los genes asociados a resistencia a antibióticos que presenta pueden ir de 65 a solamente 1 gen (cuadro 7). El serotipo se identificó como H14 (Joensen *et al.*, 2015) al igual que el genoma con mayor similitud a este, *Escherichia coli* strain MOD1-EC6837 aislada de una muestra de heces de un tipo de ovino en Estados Unidos (Ondov *et al.*, 2016). Esta cepa fue aislada en 1996 como parte de un monitoreo, realizado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) el cual tiene como objetivo la detección rápida de posibles eventos de contaminación en alimentos (Gangiredla *et al.*, 2017). Este genoma presentó una distancia evolutiva respecto a la cepa A4b de 0.0003125 y una cuenta de K-meros de 987/1,000 (Ondov *et al.*, 2016).

En cuanto a genes de resistencia a antibióticos, se destaca la presencia del gen *mdfA*, el cual puede tener un amplio rango de especificidad en cuanto a la clase de antibióticos a la cual puede presentar resistencia, por ejemplo, a fluoroquinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas, fenicoles, macrólidos entre otros (Zankari *et al.*, 2017).

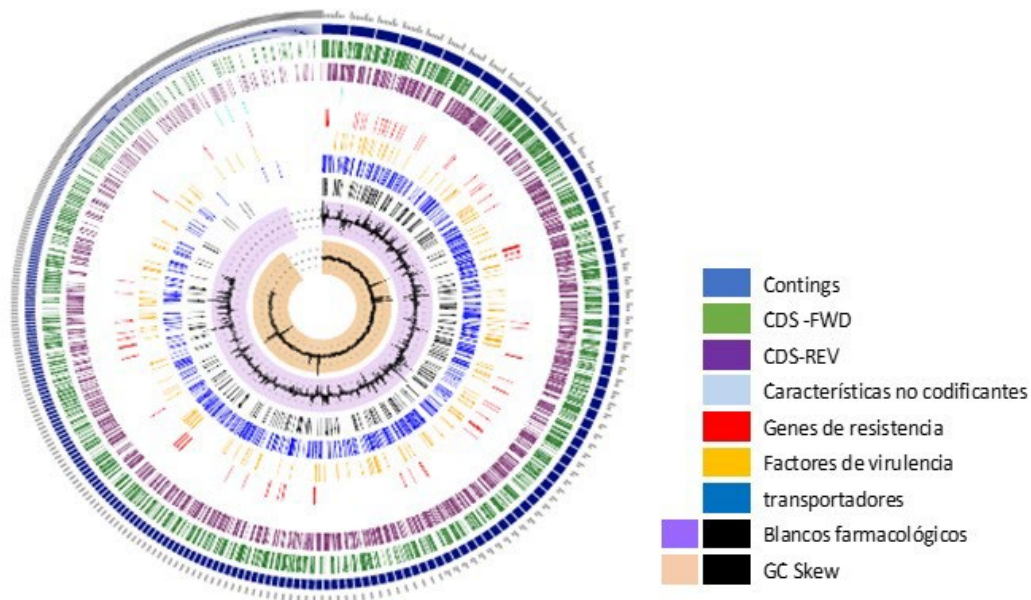


Figura 7. Genoma anotado de *E. coli* S4b con el servidor PATRICBRC. Del lado derecho se señala cada anillo de la figura circular del genoma, representando el número de contigs el anillo azul exterior y los diferentes grupos de genes de especialidad como resistencia a antibióticos, factores de virulencia, transportadores y blancos farmacológicos, representados por los anillos interiores de color rojo, amarillo, azul y negro, respectivamente.

Cuadro 8. Contenido de factores de virulencia y genes de resistencia a antibióticos en *E. coli* S4b.

<i>Escherichia coli</i> st. S4b	Fuente	Genes
Factor de virulencia	Victors	221
Factor de virulencia	PATRIC VF	206
Factor de virulencia	VFDB	69
Transportadores	TCDB	859
Blancos farmacológicos	DrugBank	365
Blancos farmacológicos	TTD	60
Resistencia a antibióticos	PATRIC	75
Resistencia a antibióticos	CARD	60
Resistencia a antibióticos	NDARO	1

6.3.4 Anotación del Genoma de *Klebsiella pneumoniae* M4g

El genoma del aislado M4g proveniente de manos de trabajadores durante la cosecha de fresa presentó una longitud de 5,496,611 pb y 5,494 secuencias codificantes, y se identificó como *K. pneumoniae*. (Figura 10). En cuanto a factores de virulencia, este genoma puede contener entre 151 y 20 genes, dependiendo de la base de datos consultada; de la misma manera, los genes asociados a resistencia a antibióticos que presenta pueden ir de 66 a solamente 7 genes (cuadro 8). El genoma con mayor similitud a éste fue el de la cepa *Klebsiella pneumoniae* serotipo 071:H10 resistente a ceftazidima, la cual fue aislada a partir de una muestra clínica en el año 2018 en Francia. Estos genomas tienen una distancia evolutiva entre sí de 0.002912 y una cuenta de K-meros de 888/1000 (Ondov *et al.*, 2016).

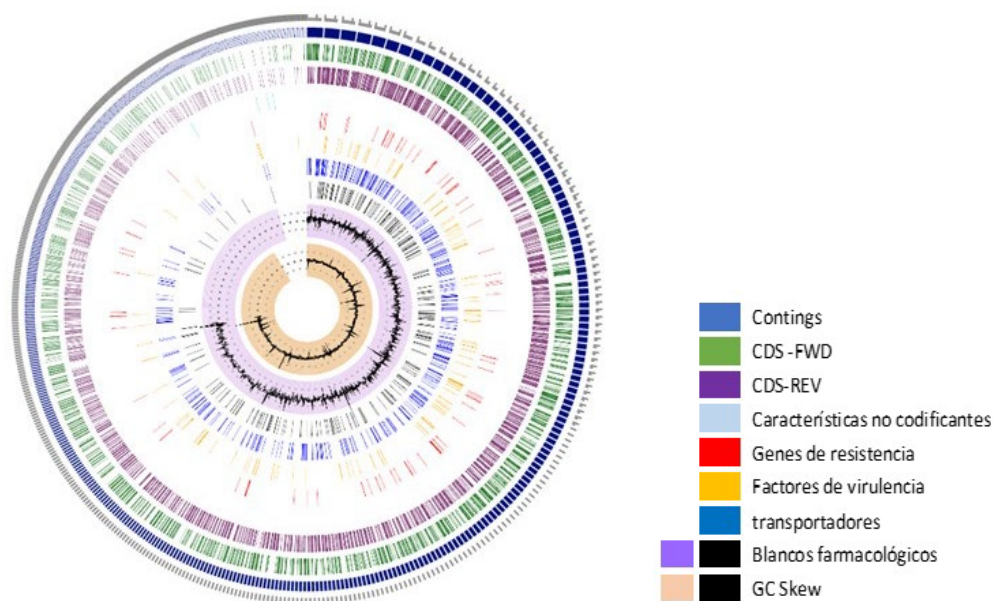


Figura 8. Genoma de *Klebsiella pneumoniae* M4g anotado con el servidor PATRICBRC. Del lado derecho se señala cada anillo de la figura circular del genoma, representando el número de contigs el anillo azul exterior y los diferentes grupos de genes de especialidad como resistencia a antibióticos, factores de virulencia, transportadores y blancos farmacológicos, representados por los anillos interiores de color rojo, amarillo, azul y negro, respectivamente.

Cuadro 9. Contenido de factores de virulencia y genes de resistencia a antibióticos en *Klebsiella pneumoniae* M4g.

<i>Klebsiella pneumoniae</i> st. M4g	Fuente	Genes
Factor de virulencia	Victors	151
Factor de virulencia	PATRIC_VF	121
Factor de virulencia	VFDB	20
Transportadores	TCDB	588
Blancos farmacológicos	DrugBank	323
Blancos farmacológicos	TTD	59
Resistencia a antibióticos	PATRIC	66
Resistencia a antibióticos	CARD	62
Resistencia a antibióticos	NDARO	7

En la búsqueda de los principales factores de virulencia de *Klebsiella*, en la cepa M4g sólo se encontró el gen de la enterobactina (*entB*), el cual, es uno de los principales sistemas sideróforos asociado tanto a cepas clásicas e hipervirulentas de *Klebsiella*. En el genoma se encontraron todos los genes involucrados en este sistema sideróforo. También se encontraron genes involucrados en

la producción de fimbrias tipo 1, las cuales están involucradas en la adherencia a mucosas o células epiteliales.

6.3.5. Anotación del Genoma de *Klebsiella quasipneumoniae* Fv4a

El genoma del aislado de fruto en punto de venta presentó un tamaño de 5,294,436 pb y un contenido G+C de 58.311 %, el cual es característico de las especies del complejo *Klebsiella pneumoniae*. Con la herramienta SimilarGenomeFinder de PATRICBRC se encontró que el genoma con mayor similitud a este aislado es el genoma de la cepa *Klebsiella pneumoniae* strain W2-9-ERG1, con una distancia evolutiva de 0.006839 y una cuenta de K-meros de 764/1000. (Ondov *et al.*, 2016).

La cepa W2-9-ERG1 fue aislada en Tailandia a partir de una muestra de agua de canal en el año 2015, esto como parte de un estudio de la presencia de *Klebsiella pneumoniae* en el ambiente hospitalario y ambiente externo. En este caso se aislaron y secuenciaron 77 genomas de *Klebsiella* a partir de muestras de hospital, de efluentes hospitalarios y de agua de canal en un radio menor a 20 kilómetros del hospital. Con el análisis filogenético de estas cepas (48 clínicas y 29 no clínicas) se demostró que los dos grupos se encontraban mezclados en el árbol filogenético, incluso compartiendo un mismo clado, lo que sugiere una divergencia reciente a partir de un ancestro común. A pesar de relación filogenética la presencia de genes de resistencia a antibióticos como B-lactamasas y factores de virulencia fue mayor en los aislados clínicos. Estos resultados indican que las cepas de ambiente y clínicas están relacionadas, sin embargo, el ambiente hospitalario ejerce una presión sobre la selección de aislados con un genotipo de virulencia y resistencia a antibióticos mayor (Runcharoen *et al.*, 2017).

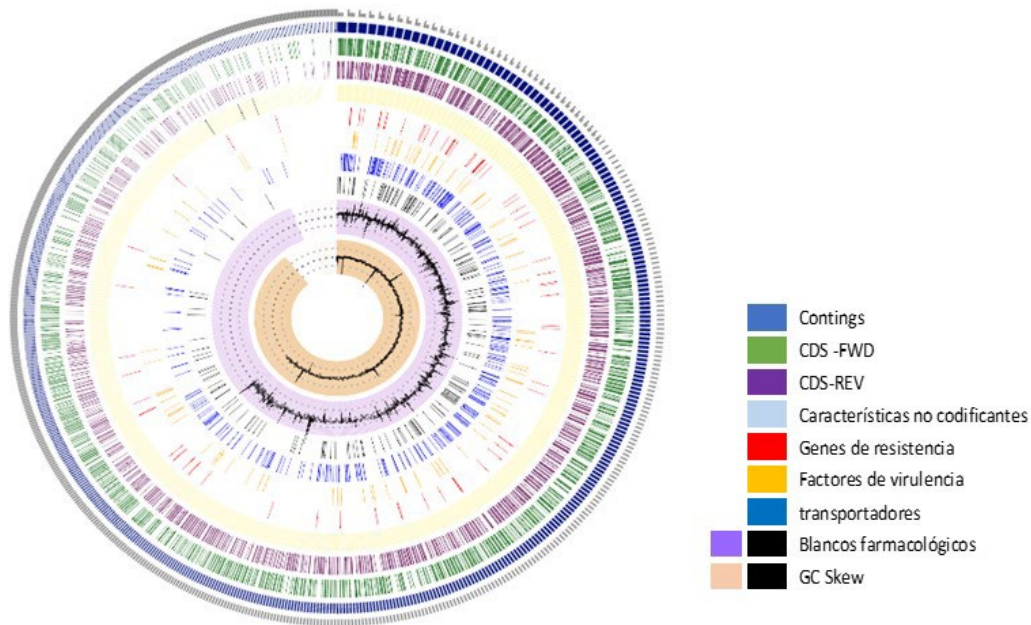


Figura 9. Genoma anotado de *Klebsiella quasipneumoniae* Fv4a con el servidor PATRICBRC. Del lado derecho se señala cada anillo de la figura circular del genoma, siendo el número de contings el anillo azul exterior y los diferentes grupos de genes de especialidad, como resistencia a antibióticos, factores de virulencia, transportadores y blancos farmacológicos, representados por los anillos interiores de color rojo, amarillo, azul y negro, respectivamente.

Cuadro 10. Contenido de factores de virulencia y genes de resistencia a antibióticos en *K. quasipneumoniae* Fv4a.

<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> Fv4a	Fuente	Genes
Factor de virulencia	Victors	150
Factor de virulencia	PATRIC VF	117
Factor de virulencia	VFDB	24
Transportadores	TCDB	595
Blancos farmacológicos	DrugBank	322
Blancos farmacológicos	TTD	61
Resistencia a antibióticos	PATRIC	65
Resistencia a antibióticos	CARD	62
Resistencia a antibióticos	NDARO	5

6.3. Perfil de Plásmidos

Los genomas obtenidos en este estudio fueron analizados para la presencia de plásmidos,

encontrando que tres de los 5 genomas poseen plásmidos (Cuadro 11). Los plásmidos presentes en los genomas son de las clases “Col” e “Inc”. Estas clases son los plásmidos más comunes en bacterias Gram-negativas patógenas y se han identificado como acarreadores de genes de resistencia a antibióticos, esto a través de la acumulación mediada por transferencia vertical y horizontal, lo que contribuye a la presencia de aislados multirresistentes y una rápida diseminación de éstos (Rozwandowicz *et al.*, 2018). Las clases de genes que transportan los plásmidos incluyen β -lactamasas, β -lactamasas ESBL, AmpC (carbapenemasas), enzimas modificadoras de aminoglucósidos, metiltransferasas de ARNr 16S y recientemente el gen de resistencia a colistina (mcr).

El genoma de *E. coli* A3a presentó dos plásmidos, IncFIB, el cual también se encontró en *Klebsiella pneumoniae* y *quasipneumoniae* (Carattoli *et al.*, 2015). Este es el subgrupo de plásmido que con mayor frecuencia se encuentra en *E. coli* y *Klebsiella*. Se ha reportado en varios países, incluyendo Alemania, Tanzania, Suiza y Japón (Ragupathi *et al.*, 2020). Mundialmente, en el grupo de plásmidos IncF se han reportado genes de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos, ESBL como *Bla^{TEM}*, *Bla^{SHV}*, *Bla^{CTX-M}* y carbapenemasas y genes de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos.

En el caso del aislado M4g, éste presentó el mayor número de plásmidos, al contener 4 (Carattoli *et al.*, 2015). El plásmido incHI1B (pNDM-MAR) se ha encontrado en cepas de *Klebsiella* pan-susceptibles, es decir, no confiere ningún tipo de resistencia (Ragupathi *et al.*, 2020). El plásmido IncFIB(K)pCAV1099-114 se ha demostrado que presenta genes de resistencia de ESBL. El plásmido IncR se ha encontrado con frecuencia en aislados de *Klebsiella pneumoniae*. El aislado Fv4a presentó dos plásmidos, IncFIB(K)pCAV1099-114 e IncR, cuyas características ya se han descrito (Carattoli *et al.*, 2015).

Cuadro 10. Perfil de plásmidos presente en el genoma de las cepas de *E. coli* y *Klebsiella* analizadas.

A3a	A4b	S4b	M4g	Fv4a
Col(pHAD28)			Col 440	IncFIB(K)pCAV1099-114
IncFIB (AP001918)			IncFIB(K)pCAV1099-114	IncR
			incHI1B (pNDM-MAR)	
			IncR	

6.4. Predicción de Patogenicidad de los Aislados Secuenciados

Tanto la presencia de genes de resistencia como de factores de virulencia contribuyen a que las cepas sean patógenas. Utilizando la herramienta PathogenFinder se encontró que los cinco aislados tienen una predicción de ser patógenos al ser humano (Cosentino *et al.*, 2013), así mismo, éstas tienen una alta probabilidad de cumplir esta predicción. De acuerdo con esta herramienta, los aislados de *E. coli* son los que tienen una mayor probabilidad de ser cepas patógenas, con una probabilidad de 0.936 en los aislados provenientes de agua y 0.946 en el aislado de superficie. En el caso de las especies de *Klebsiella*, el aislado M4g proveniente de una muestra de manos es el que menor probabilidad tiene de ser patógena (0.796) y el aislado de fruto de fresa Fv4a tiene una probabilidad de 0.855 (cuadro 11). A pesar de que los aislados de *Klebsiella* tengan una probabilidad menor de ser patógenas, son consideradas como patógenas por el programa PathogenFinder. Además, el hecho que en los resultados obtenidos en SimilarGenomeFinder de PATRIBRC el genoma con mayor similitud al de *Klebsiella pneumoniae* M4g fue un aislado obtenido a partir de una muestra clínica respalda esta predicción (Ondov *et al.*, 2016).

Cuadro 11. Resultados del programa PathogenFinder, Todos los aislados son considerados como patógenos, los aislados de *E. coli* tienen mayor probabilidad en comparación con los de *Klebsiella*.

Cepa	<i>E. coli</i> A3a	<i>E. coli</i> A4b	<i>E. coli</i> S4b	<i>K. pneumoniae</i> M4g	<i>K. quasipneumoniae</i> Fv4a
Probabilidad de ser patógeno	0.936	0.936	0.946	0.796	0.855

6.5. Genes de Resistencia a Antibióticos

Los genomas de los aislados en la presente investigación poseen una cantidad diferente de genes de resistencia a antibióticos. En el servidor RESFINDER-v4.0 se identificaron cada uno de estos genes (cuadro 13) y se señaló el posible fenotipo que éstos podrían presentar a los antibióticos (cuadro 14). De manera general, los antibióticos a los que presentaron resistencia mayor número

de cepas fueron a ciprofloxacino y tetraciclina, esto debido a la presencia del gen *mdfA* el cual tiene un amplio espectro de especificidad, confiriendo resistencia a antibióticos de la clase de macrólidos, fluoroquinolonas y tetraciclinas (Alcock *et al.*, 2020). También se destaca la presencia del gen *gyrA*, que confiere resistencia a ciprofloxacino (Bortolaia *et al.*, 2020).

Cuadro 12. Genes asociados a resistencia a antibióticos de acuerdo con la base de datos RESFINDER-v4.0.

Genoma	Gen	% identidad	Fenotipo
<i>E.coli_A3a</i>	Mdf(A)	98.21	Tiene un Amplio espectro de especificidad incluyendo Eritromicina, Tetraciclina, Rifampicina, Kanamicina, Cloranfenicol y Ciprofloxacino, pero el nivel de resistencia se desconoce
	qnrB19	100.0	Ciprofloxacino
	tet(B)	100.0	Oxyciclina,tetraciclina,minociclina
	blaTEM-1B	100.0	Amoxicilina, ampicilina, cefalotin, piperacilin, ticarcilin
<i>E.coli_A4b</i>	aadA1	99.74	Spectinomomicina, estreptomomicina
	catA1	99.84	Cloranfenicol
	mdf(A)	98.78	Macrólidos, aminoglucósidos, tetraciclinas, quinolonas, fenicoles, rifampicina, pero el nivel de resistencia se desconoce
	tet(B)	100.0	Doxiciclina, tetraciclina, minociclina
<i>E.coli_S4b</i>	mdf(A)	98.62	Macrólidos, aminoglucósidos, tetraciclinas, quinolonas, fenicoles, rifampicina, pero el nivel de resistencia se desconoce
<i>Kqp_Fv4a.</i>	blaOKP-A-5	100.0	Algunos beta-lactamicos
	fosA	92.14	Fosfomicina
	OqxA	93.96	Cloranfenicol y Compuestos cuaternarios de amonio ácido nalidixico, ciprofloxacino, trimetoprima
<i>Kp_M4g</i>	aadA1	100.0	Spectinomomicina, estreptomomicina
	blaSHV-81	99.76	Amoxicilina, ampicilina, cefalotin, piperacilin, Ticacilina
	blaSHV-110	99	Beta-lactamicos
	dfrA1	99.78	Trimetoprima
	fosA	99.28	Fosfomicina
	OqxA	100.0	Cloranfenicol, ácido nalidixico, ciprofloxacino, trimetoprima

Sul1	100.0	Sulfametoxazole
OqxB	100.0	Cloranfenicol y Compuestos cuaternarios de amonio
qacE	100.0	Compuestos cuaternarios de amonio
sul1	100.0	Sulfametoxazole

Cuadro 13. Predicción de fenotipo de resistencia con el servidor RESFINDER-v4.0.

ANTIBIÓTICO	PREDICCIÓN DE RESISTENCIA				
	A3a	A4b	S4b	M4g	Fv4a
Amikacina	R	S	S	S	S
Tigeciclina	S	S	S	S	S
Tobramicina	S	S	S	S	S
Cefepime	S	S	S	S	S
Cloranfenicol	S	R	S	S	S
Pipe+tazoba	S	S	S	S	S
Cefoxitin	S	S	S	S	S
Ampicillina	R	S	S	S	S
Ampic+ ácido clabulanico	S	S	S	S	S
Cefotaxima	S	S	S	S	S
Ciprofloxacino	R	R	S	S	R
Colistina	S	S	S	S	S
Sulfametoxazol	S	S	S	S	S
Imipenem	S	S	S	S	S
Trimetoprima	S	S	S	S	S
Ácido nalidixico	S	R	S	S	S
Ertapenem	S	S	S	S	S
Tetraciclina	R	R	S	S	S
Fosfomicina	S	S	S	S	R
Ceftazidima	S	S	S	S	S
Temocilina	S	S	S	S	S
Gentamicina	S	S	S	S	S
Meropenem	S	S	S	S	S
Azitromicina	S	S	S	S	S

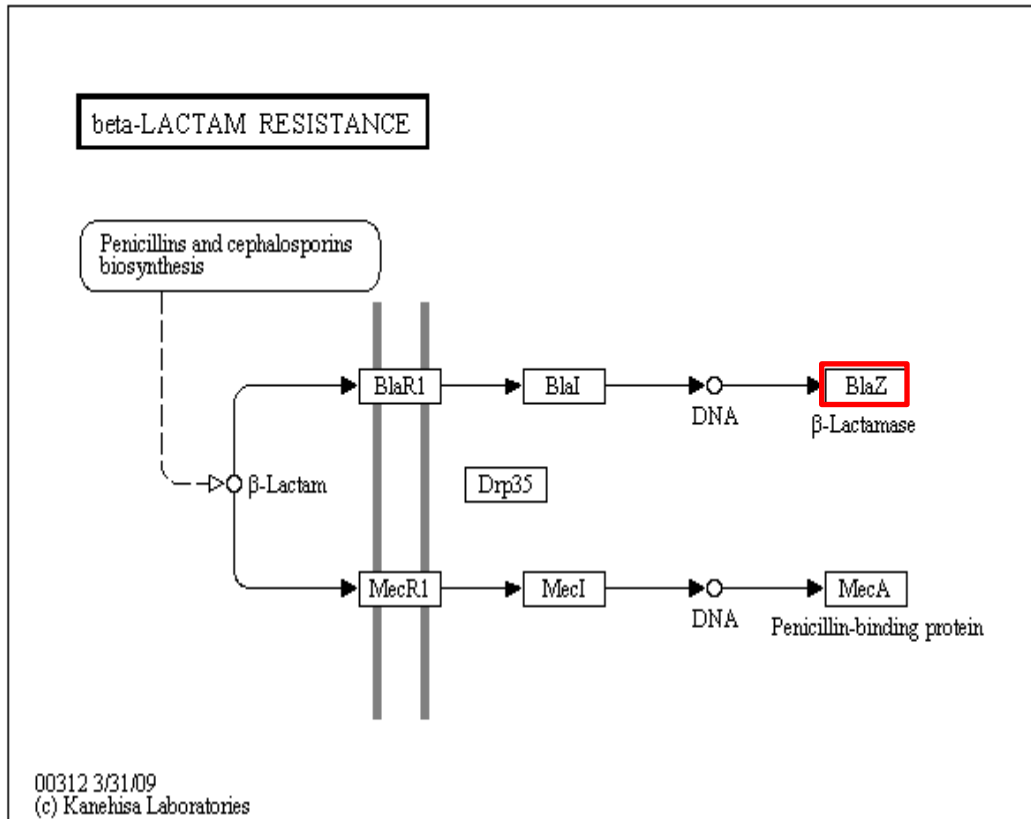


Figura 10. Ruta de resistencia a betalactámicos. Genes de betalactamasas presentes en los 5 genomas de este estudio (rojo).

6.6. Análisis Filogenético y de Pangenoma de Cepas de *E. coli* y *Klebsiella*

Una vez anotados los genomas aislados en este estudio, se realizó un análisis de pangenoma. Para esto, se seleccionaron genomas provenientes de México, de fuentes de aislamiento similares a las analizadas en este estudio como agua de irrigación y también se seleccionaron genomas provenientes de muestras clínicas de distintos países. Para el caso de las cepas de *E. coli*, se seleccionaron genomas provenientes de diferentes orígenes geográficos, incluyendo Alemania, Bolivia, China y México; así mismo, provienen de diferente tipo de muestra, incluyendo agua de irrigación, alimentos y muestras clínicas (Cuadro 15). En el caso de *Klebsiella*, se utilizaron genomas aislados principalmente a partir de muestras clínicas y de muestras ambientales provenientes de Brasil, China, Estados Unidos, México y Portugal. Cabe señalar que para el caso de *Klebsiella* se seleccionaron genomas de las especies *K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* y *K. varicola* (Cuadro 16).

Cuadro 14. Lista de genomas de *Escherichia coli* utilizados para la construcción de árbol filogenético y pangenoma

Genoma	País de origen	Muestra
<i>Escherichia coli</i> st. M28	Alemania	Agua superficial
<i>Escherichia coli</i> st. A4b	Este estudio	Agua superficial
<i>Escherichia coli</i> st. W2-5	China	Agua superficial
<i>Escherichia coli</i> st. W5-6	China	Agua
<i>Escherichia coli</i> st. E1140	China	Sedimentos
<i>Escherichia coli</i> st. S4b	Este estudio	Agua superficial
<i>Escherichia coli</i> st. MOD1-5043	México	Alimento
<i>Escherichia coli</i> st. A3a	Este estudio	Agua superficial
<i>Escherichia coli</i> st. HN80	Bolivia	Agua superficial
<i>Escherichia fergusonii</i> atcc35469	Europa	Clínica

Cuadro16. Lista de genomas de *Klebsiella* utilizados para la construcción del árbol filogenético y pangenoma.

Genoma	País de origen	Muestra
<i>K. pneumoniae</i> 1002805	México	Ambiental
<i>K. pneumoniae</i> K47	Portugal	Clínica
<i>K. pneumoniae</i> M4g	Este estudio	Manos
<i>K. pneumoniae</i> St258	Italia	Clínica
<i>K. pneumoniae</i> NIH8	Estados Unidos	Clínica
<i>K. pneumoniae</i> AqScr	México	Agua
<i>K. quasipneumoniae</i> 06219	México	Ambiental
<i>K. quasipneumoniae</i> SWT10	Brasil	Ambiental
<i>K. quasipneumoniae</i> Fv4a	Este estudio	Alimento
<i>K. quasipneumoniae</i> QH220	China	Ambiental
<i>K. quasipneumoniae</i> SCKQ0222	China	Clínica
<i>K. varicola</i> F2R9T	México	Ambiental

6.6.1. Análisis Filogenético y Pangenoma de *E. coli*

El análisis de pangenoma de *E. coli* incluyó a 10 genomas, consta de 7811 genes, estos fueron agrupados en 4 diferentes categorías: el genoma core, que incluye 2941 genes presentes en todos los genomas, el genoma accesorio, constituido por 1429 genes, 687 genes persistentes y 2754 genes presentes solo en uno de los genomas (figura 13). El orden de los genomas está dado por su

parentesco filogenético, ya que en el interior se encuentra de color naranja el genoma de *E. fergussoni*, la cual se incluyó en el análisis para comparar el género *Escherichia* y corroborar la anotación de los genomas obtenidos en este estudio como *E. coli*. Los tres aislados obtenidos en este estudio se agruparon en dos clados diferentes, esto indica que, pese a que dos de éstos se encontraron+ en agua, no comparten el mismo origen o la relación genética de estos es poca.

En el primer clado se agrupa el aislado A3a, proveniente de una muestra de agua, con un genoma proveniente de Bolivia, aislado también de agua superficial (Guzman-Otazo *et al.*, 2019). El siguiente clado incluye dos subgrupos, que en general son muy similares entre sí, de acuerdo con el heatmap del porcentaje de identidad nucleotídica (ANI, siglas en inglés). Uno de los subgrupos incluye el aislado S4b proveniente de una muestra de superficie de contacto, el cual se agrupa junto con aislados provenientes de agua superficial de diferente origen geográfico, como Alemania y China. El otro subgrupo incluye el aislado A4a proveniente de agua de irrigación junto con genomas provenientes de muestras de agua superficial y sedimentos provenientes de China y una muestra de alimentos aislada en México (Figura 14).

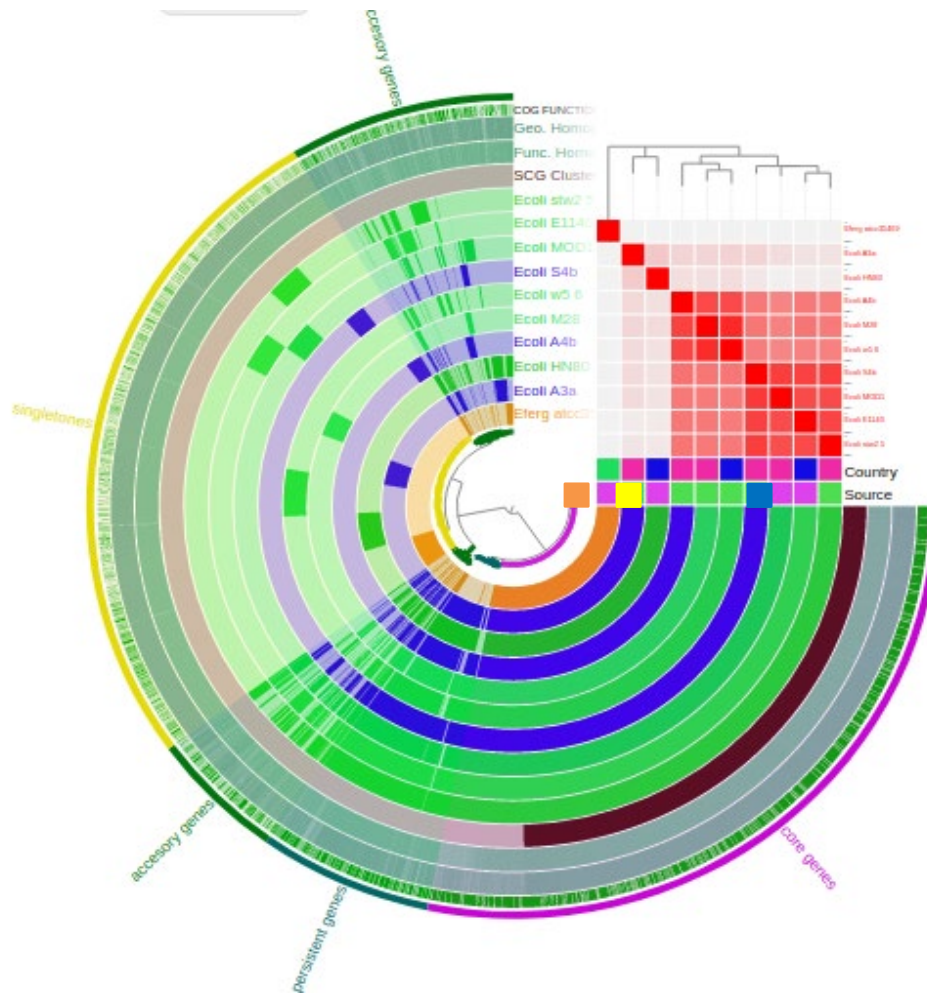


Figura 11. Pangenoma de *E. coli*. En el interior se encuentra el genoma de *E. fergussoni* (naranja) y posteriormente los genomas de *E. coli*. En azul se muestran los genomas aislados en este estudio y en verde los genomas provenientes de distintos orígenes geográficos y tipos de muestra. Fuente de aislamiento: ambiental (verde) clínico (morado). País de origen: México (rosa), China, (azul) Alemania, (amarillo), Bolivia, (naranja) Europa, (verde).



Figura 12. Árbol filogenético de genomas de *E. coli* basado en el método de máxima verosimilitud mediante la concatenación y alineamiento de los genes de una sola copia del genoma core.

6.6.2. Análisis Filogenético y Pangenoma de *Klebsiella*

El análisis de pangenoma de *Klebsiella* incluyó 12 genomas. Siguiendo la línea de trabajo de Anvino, se determinó que el pangenoma contenía 9316 genes, éstos fueron agrupados en diferentes categorías: el genoma core, que incluye 3744 genes presentes en todos los genomas, el genoma accesorio, constituido por 2319 genes, 497 genes persistentes y 2756 genes únicos dentro de los cinco genomas (Figura 15). El orden de los genomas se basa en su parentesco filogenético, los genomas se agruparon en tres clados diferentes, así en el interior se encuentra el genoma de *K. variicola* aislada en México. Posteriormente se agrupan en dos clados, uno conteniendo los de *K. quasipneumoniae* y el otro los de *K. pneumoniae*. La agrupación en tres clados diferentes y separación en tres especies se ha demostrado en diferentes estudios; uno de éstos fue el realizado por Holt y colaboradores (2015), en el cual analizaron 328 secuencias de genomas completos de *Klebsiella*, en este caso se encontró que el genoma core estuvo compuesto de 1743 genes y que el pangenoma contenía 29,886 genes; así mismo, la curva de acumulación de genes indicó que es un pangenoma abierto, por lo que con la adición de genomas el número de genes aumentará. El clado de *K. quasipneumoniae* contiene dos subgrupos, en uno se encuentra el aislado de muestra de fruto Fv4a (aislado en este estudio), junto a dos genomas de *K. quasipneumoniae*, ambos provenientes de China, una aislada de heces de aves migratorias y otra proveniente de muestra clínica; en el otro

subgrupo se encuentran dos genomas provenientes de México y Brasil, aislados a partir de muestras de orina y agua superficial, respectivamente. El segundo clado está compuesto por las cepas de *K. pneumoniae*, aisladas tanto de fuentes ambientales como clínicas, provenientes de diferentes orígenes geográficos, incluyendo México, Estados Unidos, Italia y Brasil (Figura 16).

Pese a que el número de genomas utilizados en el análisis de pangenoma fue pequeño se puede apreciar que los genomas provenientes de fuentes tanto ambientales como clínicas están interrelacionadas. Runcharoen y colaboradores (2017) realizaron un análisis filogenético de 77 genomas de *K. pneumoniae* (48 clínicos y 29 no clínicos). Este resultado sugiere una divergencia reciente de un ancestro común. En este estudio también se señala que, a pesar de la relación filogenética cercana entre cepas no clínicas y clínicas, éstas últimas presentan mayor contenido de genes de virulencia y genes de resistencia a antibióticos, lo cual podría estar mediado por el ambiente hospitalario.

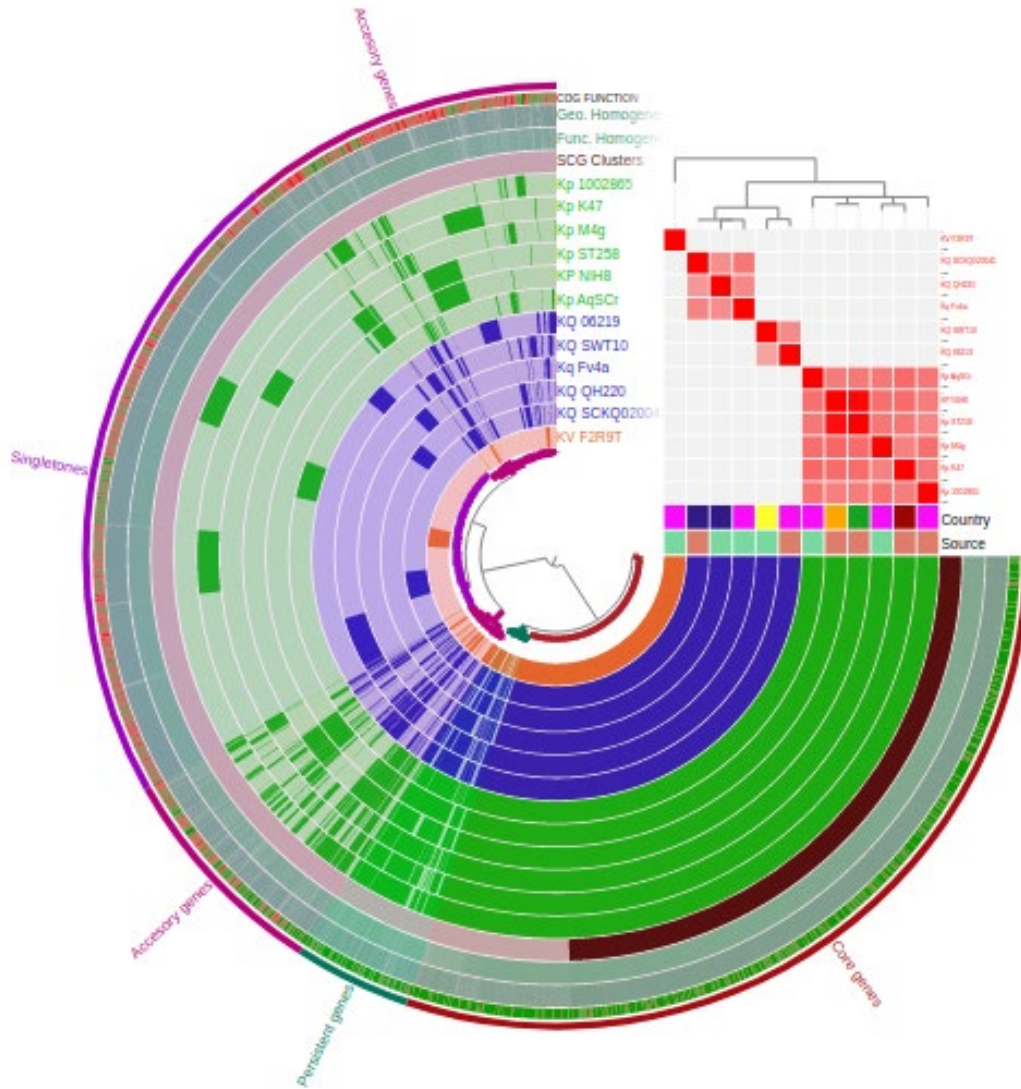


Figura 13. Pangenoma de *Klebsiella*. En el interior se encuentra el genoma de *K. variicola* (naranja), *K. quasipneumoniae* (anillos azules) y *K. pneumoniae* (anillos verdes). Fuente de aislamiento: ambiental (verde), clínico (café claro). País de origen: México (rosa), China (azul), Brasil (amarillo), Estados Unidos (naranja), Italia (verde), Portugal (café).

Tree scale: 0.001

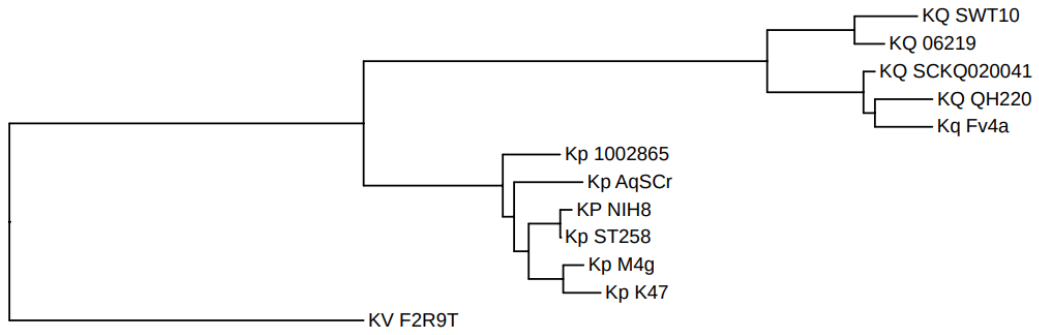


Figura 14. Árbol filogenético de genomas de *Klebsiella* basado en el método de máxima verosimilitud mediante la concatenación y alineamiento de los genes de una sola copia del genoma core.

7. CONCLUSIONES

Del total de 25 muestras analizadas el 64 % (16/25) resultó positiva a la presencia de Coliformes totales, así mismo, el 56 % (14/25) resultó positiva a la presencia de Coliformes fecales, los cuales fueron identificados como *E. coli* o *Klebsiella*. En el caso de *E. coli* esta se encontró en el 48 % (12/25) de las muestras, siendo estas principalmente las obtenidas en muestras de agua (5/5), superficies (5/5), una de manos y una de fruto en punto de venta.

Se confirmó la presencia de *E. coli* y *Klebsiella* en la cadena de producción de fresa en Culiacán. Las muestras de agua de irrigación presentaron mayor concentración de Coliformes totales y fecales, resultaron ser de diferente serotipo. La concentración de Coliformes totales y fecales en el fruto aumentó después del manejo y contacto con las superficies.

El análisis genómico mostró la presencia de los serotipos de *E. coli* (O17/O77:H18, O111:H4 y H14) en agua y superficie, en el caso de las manos de trabajadores durante la cosecha sólo se encontró *Klebsiella pneumoniae*. Ninguno de estos serotipos se encontró en el fruto en el punto de venta por lo que no se confirmó la transferencia de coliformes en la cadena de producción de fresa, sin embargo, en el fruto a la venta se encontró *Klebsiella quasipneumoniae*, la cual probablemente proviene de manos de trabajadores durante alguna etapa de manipulación ya sea cosecha, transporte, empaquetado.

Las cepas secuenciadas presentaron multiresistencia, ya que la mayoría de los aislados presentó resistencia hasta 3 antibióticos, donde se destaca la resistencia a ampicilina, tetraciclina y ciprofloxacino. Se encontraron múltiples genes asociados a virulencia y resistencia antibióticos, por lo que la presencia de estos Coliformes en los ambientes de producción indica un potencial peligro para el consumidor, por lo que es necesario aplicar procedimientos, regulación, capacitación necesarios para asegurar la inocuidad de la fresa que se comercializa en Culiacán.

8. RECOMENDACIONES

Con base en los resultados obtenidos, se sugiere realizar investigaciones posteriores con dos vertientes principales: Por un lado, continuar con la búsqueda y caracterización genotípica y fenotípica de enterobacterias en alimentos de la región; por otra parte, estimar los posibles riesgos que implica la presencia de estos organismos en los alimentos, esto mediante la evaluación cuantitativa de riesgo microbiológico enfocada a la población de Culiacán y sus alrededores, considerando la información y datos provenientes de la población local, mediante la realización de encuestas enfocadas en el consumo de los alimentos analizados.

9. REFERENCIAS

- Aguilar-Bultet L., Falquet L. 2015. Secuenciación y ensamblaje de novo de genomas bacterianos: una alternativa para el estudio de nuevos patógenos. *Revista de Salud Animal*. 37(2): 125-132.
- Alcock B.P., Raphenya A. R., Lau T.T.Y., Tsang K.K., Bouchard M., Edalatmand A., Huynh W., Nguyen A. V., Cheng A.A., Liu S., Min S.Y., Miroshnichenko A., Tran H. K., Werfalli R.E., Nasir J. A., Oloni M., Speicher D. J., Florescu A., Singh B., Faltyn M., Hernandez-Koutoucheva A., Sharma A. N., Bordeleau E, Pawlowski A.C., Zubyk H.L., Dooley D., Griffiths E., Maguire F., Winsor G. L., Beiko R.G., Brinkman F.S.L., Hsiao W.W. L., Domselaar G.V., McArthur A.G. 2020. CARD. antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res*. 8(48): 517-525.
- Alikhani M.Y., Masoumi A.Y., Khairkhan M., Farajnia S., Aslani M.M. 2011. Phenotypic and genotypic characterization of *Escherichia Coli* O111 serotypes. *Gastroenterology and Hepatology*. 4(3): 147-152.
- Bagley S.T. 1985. Habitat association of *Klebsiella* species. *Infect Control*. 6: 52–8.
- Boisen N., Østerlund M.T., Joensen K.G., Santiago A.E., Mandomando I., Cravioto A. 2020. Redefining enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): Genomic characterization of epidemiological EAEC strains. *PLoS Negl Trop Dis*. 14(9):
- Bortolaia V., Kaas R.F., Ruppe E., Roberts MC., Schwarz S., Cattoir V, Philippon A., Allesoe R.L., Rebelo A.R., Florensa A.R., Fagelhauer L, Chakraborty T, Neumann B, Werner G, Bender J.K., Stingl K., Nguyen M., Coppens J., Xavier B.B., Malhotra-Kumar S., Westh H., Pinholt M., Anjum M.F., Duggett N.A., Kempf I., Nykjaer S., Olkkola S., Wiczorek K., Amaro A., Clemente L., Mossong J., Losch S., Ragimbeau C., Lund O., Aarestrup F.M. 2020. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Aug 11.
- Brettin T., Davis J.J T. Disz, R. A., Edwards, S. Gerdes, G. J. Olsen, R. Olson, R. Overbeek, B. Parrello, G. D. Pusch, M. Shukla, J. A. Thomason, 3rd, R. Stevens, V. Vonstein, A. R. Wattam and F. Xia. 2015. RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Sci Rep*. 5: 8365.
- Carattoli A., Zankari E., García-Fernández A., Voldby Larsen M., Lund O., Villa L., Møller Aarestrup F., Hasman H. 2015. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother*;58(7):3895-903.
- Casewell M., Phillips I. 1977. Hands as route of transmission for *Klebsiella* species. *British medical journal*, 2(6098), 1315–1317. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.6098.1315>
- Castañeda-Ruelas G.M., Jiménez-Edeza M. 2018. Evaluación de ríos del valle de Culiacán, México, como reservorios de serotipos de *Salmonella* resistentes a antibióticos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 34(2), 191-201

- CDC. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet. 2017. Surveillance Report (Final Data). Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC. 2017.
- Choby J.E., Howard-Anderson J., Weiss D.S. 2020. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* – clinical and molecular perspectives (Review). *J Intern Med*; 287: 283–300.
- Cosentino S., Voldby Larsen M, Møller Aarestrup F., Lund O. 2013. PathogenFinder - Distinguishing Friend from Foe Using Bacterial Whole Genome Sequence Data. *PLoS ONE* 8(10): e77302
- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). Sistema Nacional de Información del Agua (SINA). 2018a - Estadísticas del Agua en México 2017 consultado en: <https://www.gob.mx/conagua/acciones-y-programas/usos-del-agua>
- CONAGUA, Subdirección General de Administración del Agua, Gerencia de Planificación Hídrica. Sistema Nacional de Información del Agua (SINA) <http://sina.conagua.gob.mx/sina/>. Sitio web accedido el [dd/mm/aaaa]
- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). 2018b. Atlas del Agua en México. Comisión Nacional del Agua. Subdirección General de Planeación. SINA. México D.F., México. 1z37 p.
- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). 2017. Subdirección General de Planeación. Sistema Nacional de Información de Agua. Consulta en: <http://sina.conagua.gob.mx/sina/tema.php?tema=calidadAgua&ver=mapa&o=3&n=nacional> (10-abril-19)
- Christoffels A., van Heusden P. Genome annotation: perspective from bacterial genomes. In: Ranganathan S, Gribskov M, Nakai K, Schönbach C, editors. *Encyclopedia of bioinformatics and computational biology*. Oxford: Academic Press; 2019. p. 152–156.
- Davis J.J., Wattam A.R., Aziz R.K., Brettin T., Butler R., Butler R.M., Chlenski P., Conrad N., Dickerman A., Dietrich E.M., Gabbard J.L., Gerdes S., Guard A., Kenyon R.W., Machi D., Mao C., Murphy-Olson D., Nguyen M., Nordberg E.K., Olsen G.J., Olson R.D., Overbeek J.C., Overbeek R., Parrello B., Pusch G.D., Shukla M., Thomas C., VanOeffelen M., Vonstein V., Warren A.S., Xia F., Xie D., Yoo H., Stevens R. 2020. The PATRIC Bioinformatics Resource Center: expanding data and analysis capabilities. *Nucleic Acids Res*;48(D1): D606-D612.
- DebRoy C., Roberts E., Fratamico P.M. 2011. Detection of O antigens in q. *Anim Health Res Rev*. 2011 Dec;12(2):169-85. doi: 10.1017/S1466252311000193. PMID: 22152292.
- Delbeke S. 2015. Prevalence, behavior and risk assessment of *Salmonella* spp. and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on basil leaves and strawberries. PhD thesis, Ghent University, Belgium.
- Delmont T.O. and Eren A.M. 2018. Linking pangenomes and metagenomes: the *Prochlorococcus* metapangenome. *PeerJ* 6: e4320
- Dhanji H., Murphy N.M., Akhigbe C., Doumith M., Hope R., Livermore D.M., Woodford N. 2011. Isolation of fluoroquinolone-resistant O25b:H4-ST131 *Escherichia coli* with CTX-M-14 extended-spectrum β -lactamase from UK river water. *J Antimicrob Chemother*; 66:512-

- Diwan V., Tamhankar A.J., Khandal R.K., Sen S., Aggarwal M., Marothi Y., Iyer V. R., Sundblad-Tonderski K. & Stålsby-Lundborg C. 2010. Antibiotics and antibiotic-resistant bacteria in waters associated with a hospital in Ujjain, India. *BMC Public Health* 10, 414.
- Dudley E.G., Thomson N.R., Parkhill J., Morin N.P., Nataro J.P. 2006. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 61:1267–1282
- El debate de Culiacan. 2018. Culiacan. Manos sinaloenses producen las fresas de bachigualato. *El Debate*. Recuperado de: <https://www.debate.com.mx/culiacan/culiacan-bachigualato-fresas-cultivo-cosecha--20180405-0111.html>
- Eng S., Pusparajah P., Mutalib N., Ser H., Chan K. Lee L. 2015. *Salmonella*: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Front Life Sci* 8:284–293
- Eren A.M., Esen Ö.C., Quince C., Vineis J.H., Morrison H.G., Sogin M.L., Delmont T.O. 2015. Anvi'o: an advanced analysis and visualization platform for 'omics data. *PeerJ* 3: e1319
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*. 16(12), e05500.
- Gangiredla J., Mammel M.K., Barnaba T.J., Tartera C., Gebru S.T., Patel I.R., Leonard S.R., Kotewicz M.L., Lampel K.A., Elkins C.A., Lacher D.W. Species-Wide Collection of *Escherichia coli* Isolates for Examination of Genomic Diversity. *Genome Announc.* 2017 Dec 14;5(50): e01321-17.
- Grover S.S., Sharma M., Chattopadhyaya D., Kapoor H., Pasha S.T., & Singh G. 2006. Phenotypic and genotypic detection of ESBL mediated cephalosporin resistance in *Klebsiella pneumoniae*: emergence of high resistance against cefepime, the fourth-generation cephalosporin. *Journal of Infection.* (4): 279-288.
- Guibourdenche M., Roggentin P., Mikoleit M., Fields P., Bockemuhl J., Grimont P.A., Weill F.X. 2010. Supplement 2003-2007 (no. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res Microbiol* 161:26–29.
- Guzman-Otazo J., Gonzales-Siles L., Poma V., Bengtsson-Palme J., Thorell K., Flach C. F., Iñiguez V., and Sjöling, Å. (2019). Diarrheal bacterial pathogens and multi-resistant enterobacteria in the Choqueyapu River in La Paz, Bolivia. *PLoS One*, 14(1), e0210735.
- Haley B.J., Cole D.J., Lipp E.K. 2009. Distribution, diversity, and seasonality of waterborne *Salmonella* in a rural watershed. *Appl Environ Microbiol.* (5):1248–1255.
- Holt K.E., Wertheim H., Zadoks R.N., Baker S., Whitehouse C.A., Dance D., Jenney A., Connor T.R., Hsu L.Y., Severin J., Brisse S., Cao H., Wilksch J., Gorrie C., Schultz M.B, Edwards D.J, Nguyen K.V., Nguyen TV, Dao TT, Mensink M., Minh V.L., Nhu N.T., Schultz C., Kuntaman K., Newton P.N., Moore C.E., Strugnell R.A., Thomson N.R. 2015. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proc Natl Acad Sci*;112(27): E3574-81. doi: 10.1073/pnas.1501049112.
- Iredell J., Brown J., Tagg K. 2016. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and

clinical implications BMJ. 352: 6420.

- Joensen K.G., Tetzschner A.M., Iguchi A., Aarestrup F.M., Scheutz F. 2015. Rapid and easy in silico serotyping of *Escherichia coli* isolates by use of whole-genome sequencing data. *Journal of clinical microbiology*, 53(8), 2410-2426.
- Jung Y., and Matthews K.R. 2015. Potential transfer of extended spectrum β -lactamase encoding gene, *blashv18* gene, between *Klebsiella pneumoniae* in raw foods. *Food microbiology*, 60, 39-48.
- Kaas R.S., Friis C., Ussery D.W., Aarestrup F.M., 2012. Estimating variation within the genes and inferring the phylogeny of 186 sequenced diverse *Escherichia coli* genomes. *BMC Genomics* 13:577.
- Kamruzzaman M., Patterson J. D., Shoma S., Ginn, A. N., Partridge S. R., and Iredell J. R. (2015). Relative strengths of promoters provided by common mobile genetic elements associated with resistance gene expression in Gram-negative bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(8).
- Kim H.S., Chon J.W., Kim Y.J., Kim D.H., Kim M.S., and Seo K.H. 2015. Prevalence and characterization of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in ready-to-eat vegetables. *International journal of food microbiology*, 207, 83-86.
- Kurtböke D.I., Palk A., Marker A., Neuman C., Moss L., Streeter K. and Katouli M. 2016. Isolation and characterization of Enterobacteriaceae species infesting post-harvest strawberries and their biological control using bacteriophages. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(19), 8593-8606.
- Lai Y.C., Lin A.C., Chiang M.K., Dai Y.H., Hsu C.C., Lu M.C., and Chen, Y.T. 2014. Genotoxic *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *PloS one*. 9(5).
- Larcombe S., Hutton M.L., Riley T.V., Abud H.E., Lyras D. 2018. Diverse bacterial species contribute to antibiotic-associated diarrhoea and gastrointestinal damage. *J Infect.* 77(5):417-426.
- Leverstein-van Hall M.A., Dierikx C.M., Cohen Stuart J., Voets G.M., van den Munckhof M.P., van Essen-Zandbergen A., Platteel T., Fluit A.C., van de Sande-Bruinsma N., Scharinga J., Bonten M.J., Mevius D.J. 2011. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin Microbiol Infect.* 17(6):873-80.
- López-Cuevas O., León-Félix J., Jiménez-Edeza M., Chaidez-Quiroz C. 2009. Detección y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Salmonella* en agua y suelo agrícola. *Revista fitotecnica mexicana*, 32(2): 119-126.
- Liu B.T., Zhang X.Y., Wan S.W., Hao J.J., Jiang R.D., Song F.J. 2018. Characteristics of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in ready-to-eat vegetables in China. *Front Microbiol* 9:1147.
- Liu H., Whitehouse C.A., Li B. 2018. Presence and Persistence of *Salmonella* in Water: The Impact on Microbial Quality of Water and Food Safety. *Frontiers in public health*. 6:159.
- Liu Y.C., Cheng D.L., Lin C.L. 1986. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess associated with septic endophthalmitis. *Arch Intern Med.*; 146(10): 1913–6.

- Lu M.C., Chen Y.T., Chiang M.K., Wang Y.C., Hsiao P.Y., Huang Y.J., Lin C.T., Cheng C.C., Liang C.L., Lai Y.C. 2017. Colibactin Contributes to the Hypervirulence of pks+ K1 CC23 *Klebsiella pneumoniae* in Mouse Meningitis Infections. *Front Cell Infect Microbiol.* 7:103
- McDaniel T.K., Jarvis K.G., Donnenberg M.S., Kaper J.B. 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:1664–1668.
- Medini D., Donati C., Rappuoli R. and Tettelin H. 2020. The Pangenome: a data-driven discovery in biology. En: Tettelin H. and Medini D. *The Pangenome: Diversity, Dynamics and Evolution of Genomes.* Springer International Publishing. 3-20 pp.
- Murray M., Salvatierra G., Dávila-Barclay A., Ayzanoa B., Castillo-Vilcahuaman C., Huang M., Tsukayama P. 2021. Market Chickens as a Source of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in a Peri-Urban Community in Lima, Peru. *Frontiers in microbiology*, 12, 327.
- Nash J.H., Villegas A., Kropinski A.M., Aguilar-Valenzuela R., Konczyk P., Mascarenhas M., Ziebell K., Torres A.G., Karmali M.A., Coombes B.K. 2010. Genome sequence of adherent-invasive *Escherichia coli* and comparative genomic analysis with other *E. coli* pathotypes. *BMC Genomics* 11:667.
- Nataro J.P., Kaper J.B., Robins-Browne R., Prado V., Vial P., Levine M.M. 1987. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 6:829–831.
- Nataro J.P., Mai V., Johnson J., Blackwelder W.C., Heimer R., Tirrell S Ederg SC, Braden CR, Glenn Morris J, Jr, Hirshon JM. 2006. Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. *Clin. Infect. Dis.* 43:402–407
- Nataro J.P., Yikang D., Yingkang D., Walker K. 1994. AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 176:4691–4699.
- Modificación a la norma oficial mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Diario oficial de la Federación. Consultada en: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=2063863&fecha=22/11/2000
- Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. 2015. Diario oficial de la Federación. Consultada en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5398468&fecha=26/06/2015.
- Norma Oficial Mexicana NOM-CCA-033-ECOL/1993, que establece las condiciones bacteriológicas para el uso de aguas residuales de origen urbano o municipal o de la mezcla de estas con la de los cuerpos de agua, en el riego de hortalizas y productos hortofrutícolas. 1993. Diario oficial de la federación. Consultada en: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4794222&fecha=18/10/1993
- Norma Oficial Mexicana NOM-CCA/032-ECOL/1993, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las aguas residuales de origen urbano o municipal para su disposición mediante riego agrícola. 1993. http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4794216&fecha=18/10/1993

- Ondov B.D., Treangen T.J., Melsted P. 2016. Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash, *Genome biology*. 17:132.
- Ooka, T., Ogura, Y., Katsura, K., Seto, K., Kobayashi, H., Kawano, K., Tokuoka, E., Furukawa, M., Harada, S., Yoshino, S., Seto, J., Ikeda, T., Yamaguchi, K., Murase, K., Gotoh, Y., Imuta, N., Nishi, J., Gomes, T. A., Beutin, L., & Hayashi, T. 2015. Defining the Genome Features of *Escherichia albertii*, an Emerging Enteropathogen Closely Related to *Escherichia coli*. *Genome biology and evolution*, 7(12), 3170–3179.
- Organización Panamericana de la Salud. 1995. Clasificación estadística internacional de enfermedades y problemas relacionados con la salud. 10a. revisión. 1:(554) <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/6282/Volume1.pdf>
- Qadri F., Svennerholm A.M., Faruque A.S.G. and Sack R.B. 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin. Microbiol. Rev.*18:465–483
- Rastegar S., Moradi M., Kalantar-Neyestanak D. and Hosseini-Nave H. 2019. Virulence factors, capsular serotypes and antimicrobial resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* and classical *Klebsiella pneumoniae* in Southeast Iran. *Infection & chemotherapy*, 51.
- Rock C. M., Brassill N., Dery J. L., Carr D., McLain, J. E., Bright K. R., and Gerba, C. P. 2019. Review of water quality criteria for water reuse and risk-based implications for irrigated produce under the FDA Food Safety Modernization Act, produce safety rule. *Environmental research*, 172, 616-629.
- Rock C., Thom K.A., Masnick M., Johnson J.K., Harris A.D. and Morgan D.J., 2014. Frequency of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing and non-KPC-producing *Klebsiella* species contamination of healthcare workers and the environment. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2014; 35: 426–9.
- Rodriguez-Lazaro D., Ariza-Miguel J. and Diez-Valcarce. 2015. Identification and molecular characterization of pathogenic bacteria in foods confiscated from non-EU flights passengers at one Spanish airport. *Int J Food Microbiol* 2015; 209:20-5.
- Rozwandowicz M., Brouwer M.S.M., Fischer J., Wagenaar J. A., Gonzalez-Zorn B., Guerra B., and Hordijk J. 2018. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(5), 1121-1137.
- Runcharoen C., Moradigaravand D., Blane B., Paksanont S., Thammachote J., Anun S., Peacock S. J. 2017. Whole genome sequencing reveals high-resolution epidemiological links between clinical and environmental *Klebsiella pneumoniae*. *Genome medicine*, 9(1), 1-10.
- Russo T.A. and Marr C.M. 2019. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Microbiol Rev.* 32(3).
- Sapers G. M., and Doyle M. P. 2009. Scope of the produce contamination problema. ED: Sapers G. M., Doyle M. P. and Gerba C.P. *The produce contamination problem causes and solutions*. Academic Press, Burlington, MA. 3-20 pp.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2018. Guía para la auditoría o evaluación de la conformidad de los requisitos generales para la certificación y reconocimiento de sistemas de reducción de riesgos de contaminación (SRRC), buen uso y

manejo de plaguicidas (BUMP) o buenas prácticas agrícolas en la actividad de cosecha (BPCo) durante la producción primaria de vegetales. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/390612/Gu_a_de_evaluaci_n_de_los_S_RRC_Anexo_tecnico_1_.pdf consultado el 20/06/2019.

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2015. Sistemas de Reducción de Riesgos de Contaminación (SRRC) <https://www.gob.mx/senasica/documentos/sistemas-de-reduccion-de-riesgos-de-contaminacion-srrc>

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria 2016. Lineamientos generales para la implementación de sistemas de reducción de riesgos de contaminación (SRRC) 2016

Servin, A. L. 2014. Pathogenesis of human diffusely adhering *Escherichia coli* expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): current insights and future challenges. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 823–869. doi: 10.1128/CMR.0 0036-14

Shendure J. and Ji H. 2008. Next generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 1135-1145.

Schroeder G.N., Hilbi H. 2008. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clin. Microbiol. Rev.* 21:134–156

US Food and Drug Administration. 2015. Standards for the growing, harvesting, packing, and holding of produce for human consumption. *Fed. Regist*, 80, 74353-74642.

U.S. Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service (USDA/FSIS) and U.S. Environmental Protection Agency (EPA) 2012. Microbial Risk Assessment Guideline: Pathogenic Organisms with Focus on Food and Water. FSIS.

Touchon M., Hoede C., Tenaillon O., Barbe V., Baeriswyl S., Bidet P., Bingen E., Bonacorsi S., Bouchier C., Bouvet O., Calteau A., Chiapello H., Clermont O., Cruveiller S., Danchin A., Diard M., Dossat C., Karoui M.E., Frapy E., Garry L., Ghigo J.M., Gilles A.M., Johnson J., Le Bouguéne C., Lescat M., Mangenot S., Martinez-Jéhanne Matic V.I., Nassif X., Oztas S., Petit M.A., Pichon C., Rouy Z., Ruf C.S., Schneider D., Tourret J., Vacherie B., Vallenet D., Médigue C., Rocha E.P.C. and Denamur E. 2009. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet.* 5: e1000344.

Uyttendaele M., Jaykus L.A., Amoah P., Chiodini A., Cunliffe D. Jacxsens L. and Medema G. 2015. Microbial hazards in irrigation water: Standards, norms, and testing to manage use of water in fresh produce primary production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 14(4).

Wacharotayankun R., Arakawa Y., Ohta M., Tanaka K., Akashi T., Mori M., and Kato. 1993. Enhancement of extracapsular polysaccharide synthesis in *Klebsiella pneumoniae* by RmpA2, which shows homology to NtrC and FixJ. *Infection and immunity.* 61(8), 3164–3174.

Walk ST, *et al.* 2009. Cryptic lineages of the genus *Escherichia*. *Appl. Environ Microbiol.* 75(20):6534–6544.

Wang L., Rothemund D., Curd H., and Reeves P.R. 2003. Species-wide variation in the *Escherichia coli* flagellin (H-antigen) gene. *Journal of bacteriology.* 185(9), 2936–2943.

- Wyres K.L., Lam M.M.C. and Holt K.E. 2020. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. Nat Rev Microbiol. 18, 344–359.
- World Health Organization. 2006. Guidelines for the Safe Use of Wastewater, Excreta and Greywater: Wastewater Use in Agriculture (Volume 2).
- World Health Organization. 2015. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015
- Zankari E., Alles ã.R., Joensen K.G., Cavaco L., M., Lund O., Aarestrup F.M. 2017. PointFinder: a novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 72(10):2764-2768.