

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**PRESENCIA DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS Y GENES DE  
VIRULENCIA Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN AGUA DE RIEGO  
EN HUERTAS DE CHIHUAHUA, PUEBLA Y VERACRUZ**

**POR**

**Q.F.B. ZAIRA LUCERO CASTRO DELGADO**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

**MARZO, 2020**

**PRESENCIA DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS Y GENES DE VIRULENCIA Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN AGUA DE RIEGO EN HUERTAS DE CHIHUAHUA, PUEBLA Y VERACRUZ**

**COMITÉ DE TESIS**



---

**Dra. Luisa Yolanda Solís Soto**  
**Presidente**



---

**Dr. José Angel Merino Mascorro**  
**Secretario**



---

**Dr. José Santos García Alvarado**  
**Vocal I**



---

**Dr. Jorge Esteban de Jesús Dávila Aviña**  
**Vocal 2**



---

**Dra. Norma Laura Heredia Rojas**  
**Vocal 3**

PRESENCIA DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS Y DETECCIÓN DE  
GENES DE VIRULENCIA Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS A PARTIR DE  
MUESTRAS DEEN AGUA DE RIEGO EN HUERTAS DE CHIHUAHUA,  
PUEBLA Y VERACRUZ.

Presentado por: Q.F.B. Zaira Lucero Castro Delgado.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de los Microorganismos del departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la Dirección de la Dra. Luisa Yolanda Solís Soto y la asesoría del Dr. José Ángel Merino Mascorro, Dr. José Santos García Alvarado, Dr. Jorge Esteban de Jesús Dávila Aviña, Dra. Norma Laura Heredia Rojas. El trabajo fue financiado parcialmente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT) en cuanto a beca No. 843766 otorgada a la Q.F.B. Zaira Lucero Castro Delgado y por el proyecto A1-S-25033, "Rastreo y Movilidad del Resistoma en el Bacterioma de Ambientes Agrícolas" del PROGRAMA DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA (PAICYT) DE LA UANL, 2019.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Comité de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por brindarme la beca de Maestría (No. 843766) para así poder tener el sustento durante este proceso. Así como a la Facultad de Ciencias Biológicas y al Laboratorio de Bioquímica y Genética de los Microorganismos de la Universidad Autónoma de Nuevo León

A mi madre, que es pilar más importante en mi vida, por apoyarme en cada reto y sueño que me pongo, gracias por ser ese Ángel que siempre está en vela por mí. Cada uno de mis logros siempre serán principalmente para ti. Eres una mujer maravillosa.

A mi hermano, el hombre de mi vida, gracias por el apoyo brindado y por ser mi ejemplo a seguir, mi mejor amigo y mi cómplice.

A mi padre, mi hombro en todo momento sin tu apoyo moral no hubiera podido continuar, gracias por la fuerza.

A mi familia que desde lejos me apoyo, quienes siempre me han estado conmigo, sobre todo a mi ahijado Sayd y mi abuelita Carmen.

A mis amigos, mis viejos y siempre fieles amigos, en especial a mi mejor amiga Astrid quien siempre me ha apoyado.

A mis nuevos amigos conocidos en la maestría Gabriel, Edeer, Tania, Pedro, Katya, Ricardo, Ana, Andrea, a mis amigas de softbol Mariana, Fernanda, Damaris, Emma, Karlita y mi coach Jenni y amigos conocidos en Monterrey, sin duda ustedes fueron esa familia que encontré en otro lugar.

A Roberto por el apoyo, la compañía y los buenos momentos.

A mi fiel perrita Weenie, mi compañerita en todo momento.

A la Dra. Norma Heredia y el Dr. Santos García por permitirme ser parte del LABGEM y apoyarme en el transcurso de mi proyecto.

A mi compañeros y Doctores de LABGEM por todo el apoyo brindado y las buenas experiencias, un gran equipo de trabajo.

Al Dr. Jorge E. Dávila, por su paciencia y apoyo durante el muestreo y el proceso de la maestría.

A la Dra. Luisa Y. Solís, por su gran apoyo tanto en mi proceso de la maestría como en mi vida personal, gracias por brindarme la confianza y la seguridad durante este proceso, me llevo el gusto de haber sido su alumna y poder recibir de sus conocimientos, sin duda una excelente persona y asesora de tesis.

A Dios que siempre está presente en cada segundo de mi vida siendo la luz y la fuerza para continuar con mis estudios profesionales.

## **DEDICATORIA**

A mi madre, mi hermano, mi papá, mi abuelita, mi ahijado Sayd y a Dios, por ser la fuerza y mi más grande alegría, ustedes me han formado como persona. Los amo.

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	III
DEDICATORIA .....	V
LISTA DE SÍMBOLOS .....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS .....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT .....	XV
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2.- ANTECEDENTES .....	2
2.1. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs).....	2
2.2 Contaminación por aguas de riego .....	3
2.3 Microorganismos presentes en aguas de riego .....	4
2.3.1 <i>Salmonella</i> .....	4
2.3.2 <i>Enterococcus</i> spp .....	6
2.3.3 <i>Escherichia coli</i> .....	7
2.4 Resistencia a antibióticos .....	12
3. JUSTIFICACIÓN .....	15
4. HIPÓTESIS .....	16
5. OBJETIVOS .....	17
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
6.1 Área de trabajo .....	18
6.2 Recolección de muestras .....	18
6.3.1 Aislamiento e Identificación de microorganismos patógenos en agua de riego. ....	18
6.4 Confirmación de aislados por detección de genes de virulencia.....	19
6.4.1 Extracción de DNA a partir de los aislados obtenidos .....	19
6.4.2 Detección de genes por PCR punto final .....	20
6.5 Identificación de resistencia a antibióticos.....	21
6.6 Identificación de genes resistencia a antibióticos.....	22
7. RESULTADOS.....	25
7.1. Aislamiento de microorganismos patógenos en agua de riego .....	26
7.2 Confirmación de aislados .....	30
	VI

7.3. Resistencia a Antibióticos .....	31
7.4 Genes de resistencia a antibióticos .....	33
8. DISCUSIÓN .....	34
9. CONCLUSIONES .....	43
10. PERSPECTIVAS .....	44
11. BIBLIOGRAFÍA .....	45
12. RESUMEN BIBLIOGRÁFICO .....	62



## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>Símbolo</b>	<b>Definición</b>
%	Por ciento, porcentaje
$\beta$	Beta
°C	Grados Celsius
h	Horas
$\mu\text{g}$	Microgramos
$\mu\text{l}$	Microlitros
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\mu\text{m}$	Micrómetro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
pH	Potencial de hidrógeno
kb	Kilobase
g	Gramo
ml	Mililitros
XLD	Xylose Lysine Deoxycholate
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (por sus siglas en inglés)
TTC	Cloruro de trifeniltetrazolio
MCK	Agar MacConkey
SMAC	MacConkey- sorbitol
EMB	Eosina azul de metileno
L	Litro
Xg	Por gravedades

PBS	Amortiguador salino de fosfatos (por sus siglas en inglés)
s	Segundos
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
miliQ	Milipura ultrapura
U	Unidades
min	Minutos
UFC	Unidad Formadora de Colonias
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
pb	Pares de bases
UV	Luz ultravioleta
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatógena
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
DAEC	<i>E. coli</i> adherencia difusa
NMEC	<i>E. coli</i> neonatal meningitis
UPEC	<i>E. coli</i> uropatógena
EAF	Factor de adherencia (por sus siglas en inglés)
tEPEC	Típica <i>E. coli</i> enteropatógena
aEPEC	Atípica <i>E. coli</i> enteropatógena
CDC	Centro de control de enfermedades (por sus siglas en inglés)
OMS	Organización Mundial de la Salud
FDA	Food and Drug Administration

FSMA	Food Safety Modernization Act
SPI	Islas de Patogenicidad
LT	Termolábil
ST	Termoestable
NOM	Norma Oficial Mexicana

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados y sus genes blanco .....	21
Tabla 2. Genes de resistencia a antibióticos.....	23
Tabla 3. Zona y procedencia de las muestras.....	26
Tabla 4. Aislados presuntivos de los microorganismos patógenos en los estados de Chihuahua Puebla y Veracruz.....	28
Tabla 5. Aislamientos presuntivos procedentes de cada muestra en los diferentes estados.....	29
Tabla 6. Microorganismos patógenos confirmados a partir de muestras de agua de riego.....	31
Tabla 7. Resistencia a antibióticos en los aislados patógenos.....	32

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Colonias presuntivas de los microorganismos. 1. <i>Salmonella</i> spp agar XLD; 2. <i>Enterococcus</i> spp en agar KF <i>Streptococcus</i> ; 3. EHEC en agar SMAC; 4. EHEC y otras <i>E. coli</i> en SMAC; 5. <i>E. coli</i> en EMB.....	27
Figura 2. Porcentaje de resistencia y sensibilidad a antibióticos entre las cepas analizadas.....	33

## RESUMEN

En los últimos años el índice de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) ha incrementado, derivado del consumo más saludable que desean los individuos, lo que implica que se consuman productos crudos o poco procesados, pudiendo estos estar contaminados con microorganismos patógenos.

Dicha contaminación puede provenir de diversas fuentes, tales como el suelo, el uso de abonos, la manipulación o el agua de riego, la cual muchas veces no cuenta con un control microbiológico. Dentro de los patógenos asociados a contaminación de agua destacan *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Enterococcus* spp entre otros. En la actualidad, la escasez de agua potable ha afectado no sólo en el consumo diario de la población, sino también en los suministros de agua de riego para cultivos, es así como el uso de aguas de riego contaminadas con microorganismos patógenos resulta un factor clave para que, a su vez, estos patógenos puedan contaminar los productos vegetales que con ellas se irrigan, aumentando con ello la posibilidad de ocasionar ETAs.

Dada la importancia de detectar la presencia de los microorganismos patógenos además de sus genes de virulencia y resistencia a antibióticos en muestras de agua de irrigación, se realizó la búsqueda y el aislamiento de microorganismos como *Salmonella* spp, *Enterococcus* spp, *E. coli* y sus patotipos (EHEC, EPEC, ETEC EAEC) en aguas utilizadas para el suministro de riego o ríos localizados cerca de huertas en Chihuahua, Puebla y Veracruz, se realizó la confirmación de los aislados mediante la búsqueda de genes de virulencia además se determinó su perfil de resistencia a ciertos antibióticos, mismos que fueron buscados también por sus genes. A partir de 30 muestras colectadas (10 en cada estado) se logró el aislamiento de 496 aislados presuntivos, de los cuales se identificaron ocho patógenos mediante sus genes de virulencia, dos *Enterococcus* spp (*eda*<sup>+</sup>, *ccf*<sup>+</sup>, *efa*<sup>+</sup>, *gelE*<sup>-</sup>), dos tEPEC (*eae*<sup>+</sup>, *bfp*<sup>+</sup>), una aEPEC (*eae*<sup>+</sup>, *bfp*<sup>-</sup>) estas provenientes de Veracruz, así como dos aEPEC (*eae*<sup>+</sup>, *bfp*<sup>-</sup>) y una ETEC (*lt*<sup>+</sup>) provenientes de Puebla. En el caso de *Salmonella* spp

ninguno fue confirmado por la técnica de PCR. De Chihuahua no se obtuvo ningún aislado confirmado para estos patógenos. A los 8 aislados confirmados se les determinó su resistencia fenotípica a antibióticos, donde todos los fueron resistentes al menos a tres antibióticos, siendo la vancomicina el antibiótico con mayor resistencia, mientras que ningún aislado presentó resistencia para el trimetoprima y ciprofloxacino. Así mismo a estos aislados confirmados se les buscó genes de resistencia a antibióticos, donde el único gen encontrado fue el *tetA* en la cepa de ETEC proveniente de Puebla.

## ABSTRACT

In the last years, the rate of foodborne diseases has increased, derived from the healthiest consumption that individuals want, which implies that raw or under-processed products are consumed, and these may be contaminated with pathogenic microorganisms.

This contamination could come from various sources, such as soil, fertilizer use, handling or irrigation water, which often does not have a microbiological control. *Escherichia coli* (pathotypes), *Salmonella spp*, *Enterococcus spp* have been associated as pathogenic bacteria in water used to irrigation crops, increasing the possibility of causing foodborne diseases.

Due to the importance to determine the presence of pathogenic microorganisms, such as *Salmonella*, *Enterococcus*, *E. coli* pathotypes (EHEC, EPEC, ETEC EAEC), in addition to their virulence and antibiotic resistance genes in irrigation water samples, we realize the isolation of these bacteria in waters used for irrigation supply or rivers located near farms in Veracruz, Chihuahua and Puebla. The bacterial confirmation of isolates was realized through virulence genes. Their antibiotic resistance profile to certain antibiotics and specific genes of resistance to the antibiotic was done. From 30 samples collected (10 in each state) the isolation of 496 presumptive were obtained, of which eight pathogens were identified by their virulence genes, two *Enterococcus spp* ( $eda^+$ ,  $ccf^+$ ,  $efa^+$ ,  $gelE^-$ ), two tEPEC ( $eae^+$ ,  $bfp^+$ ), one aEPEC ( $eae^+$ ,  $bfp^-$ ) were isolated from Veracruz water samples, as well as two aEPEC ( $eae^+$ ,  $bfp^-$ ) and one ETEC ( $lt^+$ ) from Puebla. No one presumptive isolated was confirmed as pathogen from samples of Chihuahua. From eight isolates, their phenotypic resistance to antibiotics was determined, of them, all were resistant to at least three antibiotics, vancomycin was the antibiotic with the highest resistance, the opposite case for trimethoprim and ciprofloxacin since no bacteria showed resistance. From these confirmed isolates we identify antibiotic resistance genes and only one was positive to *tetA* in the ETEC strain from Puebla.



## 1. INTRODUCCIÓN

Ya desde hace muchos años, las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) han sido un problema de salud a nivel mundial, considerándose estas por la OMS (2018) como una de las diez amenazas a nivel mundial, donde también se incluyen gripe pandémica, cólera, difteria, paludismo, catástrofes naturales, meningitis, malnutrición entre otros. Las ETAs desafortunadamente han ido en aumento, ya que la globalización y la preferencia por alimentos saludables conlleva al consumo de productos frescos o mínimamente procesados. Dentro de los patógenos asociados a este tipo de productos se ha reportado a *E. coli* del grupo patogénico (los cuales incluyen EHEC, EPEC, ETEC, EAEC), *Salmonella* spp, *L. monocytogenes*, *Shigella* spp, entre otros (Ocaña et al. 2015). Dentro de las principales fuentes de contaminación en la agricultura se encuentra el uso de agua de riego ya que ésta pudiera ser no potable, además, la ubicación geográfica de las huertas debido a que estas pudieran estar cerca de aguas residuales, proviniendo quizá de hospitales, casas, restaurantes, escuelas, etc (OMS, 2018).

Los microorganismos presentes en agua de riego incluyen bacterias patógenas, las cuales al poseer genes de virulencia y probablemente de resistencia a antibióticos pudieran transferir estos genes a bacterias no patógenas también presentes en estos ambientes. Es por lo anterior que en este trabajo se realizó la búsqueda de bacterias patógenas a las cuales se les determinó la presencia de genes de virulencia, su resistencia fenotípica y genotípica a ciertos antibióticos a partir de muestras de agua de riego utilizadas en diferentes zonas agrícolas de México (Chihuahua, Puebla y Veracruz).

## 2.- ANTECEDENTES

### 2.1. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs)

De acuerdo con la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por su siglas en inglés), las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son aquellas causadas por el consumo de alimentos o bebidas contaminadas con microorganismos patógenos pudiendo ser virus, bacterias, hongos, parásitos y/o toxinas derivadas de éstos (Kirk et al. 2015). La sintomatología causada por estas enfermedades se caracteriza principalmente por náusea, vómito, diarrea, dolor abdominal y fiebre (Soto Varela et al. 2016).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) 600 millones de personas, es decir, al menos 1 de cada 10 personas a nivel mundial, se reportan enfermas cada año debido al consumo de alimentos contaminados, de las cuales 420,000 derivaron en muerte, siendo los niños menores de 5 años los más vulnerables con un 40% de la carga de ETAs y 125 000 muertes por año (OMS, 2019). Dentro de los patógenos más frecuentemente asociados a ETAs se encuentran *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *L. monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio* spp, *C. jejuni/coli* y los grupos patogénicos de *E. coli* (Soto Varela et al. 2016).

Según el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en ingles), en Estados Unidos, se estima que cada año 48 millones de personas se enferman por ETAs, de los cuales 128,000 son hospitalizados y 3,000 mueren. Los cinco microorganismos más comúnmente responsables de ETAs en este caso son: Norovirus, *Salmonella* no tifoidea, *C. perfringens*, *Campylobacter*, *S. aureus*, así como también se han presentado en gran frecuencia: *C. botulinum*, *Listeria*, *E. coli* y *Vibrio* (CDC, 2019).

## **2.2 Contaminación por aguas de riego**

La contaminación en productos agrícolas depende de diversos factores en el ambiente, y puede darse antes, durante y después de la cosecha. Factores de contaminación previos a la cosecha se han relacionado con el suelo, el uso de estiércol, el ganado/vida silvestre, el agua de riego, en el caso de la contaminación durante la cosecha puede deberse a la manipulación propia de los productos, en tanto que, posterior a la cosecha, generalmente se debe a su transporte o contaminación durante la venta (Alegbeleye et al. 2018; Antwi-Agyei et al. 2015).

De acuerdo con la FSMA (Food Safety Modernization Act por sus siglas en inglés), define al agua agrícola como aquella que está destinada o es probable que entre en contacto con los productos durante el cultivo (agua de riego) y el agua utilizada durante la cosecha, envasado y almacenaje (SENASICA 2017).

El agua de riego utilizada durante el cultivo, es una ruta de contaminación muy frecuente en los productos agrícolas ya que puede provenir de diversas fuentes y por ende con diversidad microbiana. Estas aguas pueden ser de lluvia, subterráneas o poco profundas, superficiales (incluyendo estanques, lagos, ríos y arroyos) y residuales ya sea sin tratar o tratadas de forma inadecuada. La contaminación puede ser con microorganismos provenientes de heces, desechos de hospitales, desechos de hogares, etc. (Alegbeleye et al. 2018; Antwi-Agyei et al. 2015). El riesgo del uso de aguas no tratadas aumenta, ya que al tener bacterias patógenas, éstas pueden poseer genes de virulencia y resistencia a ciertos antibióticos los cuales pudieran transferirse a otras bacterias mediante elementos génicos transferibles y móviles (Servais y Passerat 2009).

Otro de los factores de riesgo para que el agua contamine los productos agrícolas incluye la ubicación geográfica de ciertas huertas ya que gran parte de ellas se encuentra cerca de aguas residuales, contribuyendo con ello a la presencia de microorganismos patógenos (Alegbeleye et al. 2018).

### **2.3 Microorganismos presentes en aguas de riego**

Dentro de las principales causas de contaminación del agua se incluyen las actividades agropecuarias, movilización de animales, cultivos, abonos mal procesados, los desechos de los hogares y de los hospitales, los cuales proporcionan diversos microorganismos patógenos al agua (Rios et. al 2017). La presencia de contaminación por heces procedentes de animales y humanos pueden contaminar el agua de riego, el suelo y con ello contribuir a la transferencia de resistencia a los antibióticos en caso de que bacterias presentes en ellas los posean (Gonzales-Siles y Sjöling, 2016).

La presencia de bacterias en el agua es común, sin embargo, al descargarse bacterias en ríos u otras fuentes de agua, se exponen a ambientes más fríos y menos nutritivos, a los cuales las bacterias regulan su metabolismo para hacer frente a las distintas condiciones ambientales. La entrada al agua detiene el crecimiento y división de gran parte de las bacterias, sin embargo, estas pueden permanecer viables y persistir a tiempos muy prolongados, representando una grave amenaza para la diseminación de diversas bacterias resistentes y enfermedades (Gonzales-Siles y Sjöling, 2016). Algunos de los microorganismos con supervivencia a dichos factores se han descrito *E. coli* y sus patotipos, así como *Enterococcus* (Berthe et al. 2013).

Con respecto a microorganismos patógenos que se han identificado en agua de riego se encuentran: *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. enterica*, (Ocaña-de Jesús et al. 2015) *Shigella* y *Aeromonas*. Además, también se ha reportado virus como el norovirus y parásitos como *Cyclospora* (Rincón V et al. 2010; OMS, 2019).

#### **2.3.1 Salmonella**

Las bacterias de este género son bacilos Gram-negativos, anaerobias facultativas, con una temperatura óptima de crecimiento de 37°C y no formadora de esporas. Se clasifica en dos especies, *S. bongori* (subespecie V) y *S. enterica* (comprendida de siete subespecies, I, II, IIIa, IIIb, IV, VI y VII). Se han descrito dos serotipos de *S. enterica*: *S. enterica* Typhimurium con amplios huéspedes, como roedores, ganado y mamíferos y

*S. enterica* Typhi limitada a únicamente el humano como huésped (Garai et al. 2012; Dougnon et al. 2017) .

Dentro de los factores de virulencia presentes en este microorganismo se encuentran principalmente cinco islas de patogenicidad (SPI), de las cuales la SPI1 y SPI2 codifican para el sistema de secreción tipo III. Albergan el gen para invasión (*invA*) además de genes como *SpiC* que codifica componentes de estructura y secreción, así como el gen *orfL*, que es necesario para la supervivencia dentro del macrófago y posiblemente lleva un sistema involucrado en la secreción de toxinas. Estos genes se encuentran codificados en el cromosoma, sin embargo también existe la presencia de genes en plásmido (Dougnon et al. 2017)

De acuerdo con el CDC (2019), se estima que por año *Salmonella* causa 1.35 millones de enfermedades, con 26,500 hospitalizaciones y hasta 420 muertes aproximadamente tan solo en Estados Unidos. Se considera uno de los patógenos causantes de diarrea más importantes transmitidas por alimentos a nivel mundial, junto con *E. coli*, norovirus, *Cyclospora* y *Shigella* de acuerdo con la OMS (OMS, 2019).

*Salmonella* tiene la capacidad de adaptarse al tracto gastrointestinal de los animales, de donde puede ser liberada al ambiente a través de las heces, las cuales, a su vez, pueden contaminar aguas superficiales a través de la lluvia y la escorrentía superficial una vez que sobrevive diversos desafíos ambientales, tales como la radiación ultravioleta de la luz solar, la falta de nutrientes, la temperatura y el pH (Liu et al. 2018; Levantesi et al., 2012)

La dosis infecciosa de *Salmonella* es de  $10^5$ - $10^9$  células viable/g. Se adapta al pH ácido del estómago y una vez en el intestino, la infección se establece por dos modos: mediante la ruptura de células M que conduce a la absorción por medio endocitosis mediada por receptores o bien, mediante fagocitosis directa por las células dendríticas. La membrana de las células epiteliales se modifica para facilitar la entrada de las bacterias. Una vez dentro del intestino, los macrófagos, las células T, las células B, neutrófilos absorben a *Salmonella* (Garai et al. 2012).

Esta bacteria causa dos síndromes principales: Salmonelosis y fiebre tifoidea. La primera se origina por el consumo de diversos alimentos contaminados con este patógeno incluyendo productos frescos vegetales, aguas contaminadas y alimentos de origen animal (Rodríguez et al. 2008) donde la principal causante es *Salmonella enterica* ser. Typhimurium. En el caso de la fiebre tifoidea y paratifoidea son enfermedades sistémicas graves y contagiosas causadas por los serovares Typhi y Paratyphi (Levantesi et al. 2012). Ambos síndromes tienen síntomas diversos como diarrea inflamatoria, fiebre, dolor de cabeza, malestar general entre los 6-30 días después de adquirir la bacteria (Gunn et al. 2014).

Dentro del tratamiento de elección para esta bacteria se reporta el uso de cefalosporinas, ciprofloxacina, amoxicilina, ampicilina o sulfa con trimetoprima, sin embargo también se ha reportado su capacidad de resistir a antibióticos, tales como los  $\beta$ -lactámicos, ceftriaxona, ampicilina, cloranfenicol, trimetoprima y fluoroquinolonas (Garai et al. 2012; Adesiji et al. 2014)

Diversas investigaciones sugieren la importancia de la presencia de *Salmonella* en agua de riego como una ruta de contaminación en los productos, ya que se ha identificado principalmente en aguas superficiales como ríos, lagos y estanques, fuentes importantes para el agua de riego. Este patógeno tiene la capacidad de sobrevivir en ambientes acuáticos mediante diversos mecanismos, tales como la entrada en el estado viable no cultivable y/o residir en protozoos de la vida libre (Liu et al. 2018; Levantesi et al., 2012)

### **2.3.2 *Enterococcus* spp**

Estos microorganismos son cocos Gram-positivos no productores de catalasa, anaerobios facultativos, no formadores de esporas, con crecimiento en un amplio rango de temperatura (10-45°C) y de pH (4.6-9.9) así como en presencia de cloruro de sodio y sales biliares, lo cual le confiere la capacidad de sobrevivir en ambientes marinos por su capacidad de tolerar las altas concentraciones de sal (Alipour et al. 2014).

A pesar de formar parte de la microbiota de humanos y animales, pueden dar lugar a enfermedades graves sobre todo nosocomiales, para lo cual, la especie *E. faecalis* es la asociada, ya que su incidencia es de 1-2 episodios por cada 1000 pacientes hospitalizados (Fernández et al. 2004).

Dentro de los factores de virulencia de *E. faecalis* se encuentran sustancias de agregación (*asa<sub>1</sub>*), citolisina (*cyl*), hialuronidasa (*hyl*), la proteína de superficie enterococcal (*esp*) y gelatinasa (*gelE*), además factores de virulencia codificados en los genes *agg* localizados en las islas de patogenicidad de 150 kb, la cual anteriormente era desconocida (Arabestani et al. 2017; Ben Said et al. 2016).

Los enterococos se encuentran en altas concentraciones en las heces humanas, generalmente entre  $10^4$  y  $10^6$  células/g de peso húmedo (Boehm y Sassoubre, 2014). Usualmente son fácilmente cultivables y representan riesgos para la salud humana por la exposición a aguas contaminadas ya que son bacterias indicadoras de contaminación fecal en alimentos y sobre todo en pruebas de calidad del agua (Byappanahalli et al. 2012)

Se ha reportado su capacidad de resistencia a antibióticos tales como la vancomicina, cefalosporina y bajos niveles de penicilina y aminoglucósidos, polimixina, lincosamida, trimetoprima-sulfametoxazol, monobactamas, estreptomina, cloranfenicol, tetraciclinas, en aislados de *Enterococcus* spp procedentes de aguas residuales. (Arabestani, Nasaj and Mousavi 2017; Ben Said et al. 2016; Martins da Costa et al. 2006). Desafortunadamente también se han reportado cepas resistentes a múltiples fármacos las cuales se han convertido en las principales causas de infecciones adquiridas en el hospital (Boehm & Sassoubre, 2014)

### **2.3.3 *Escherichia coli***

Es un bacilo Gram-negativo, anaerobio facultativo, móvil por flagelos, no formador de esporas, perteneciente a las gammaproteobacterias, de la familia *Enterobacteriaceae*. Su

pH óptimo de crecimiento es de 4.4 y su temperatura es de 37°C (Soto Varela et al. 2016).

Esta bacteria se encuentra ampliamente distribuida formando parte de la microbiota intestinal de mamíferos, además de aves, reptiles y peces, y es muy común que se encuentre presente en suelo, agua, plantas y diversos alimentos, tanto de origen vegetal como animal (Blount 2015).

A pesar de ser parte de la microbiota intestinal, se han reportado diferentes grupos patogénicos causantes de enfermedades diarreicas, peritonitis, colitis, bacteremia, e infecciones del tracto urinario. Dichos grupos patogénicos se han clasificado en patotipos de acuerdo a sus factores de virulencia y mecanismo de patogenicidad integrándose en seis grupos también conocidas como *E. coli* diarreogénicas (DAEC): Enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC), enterotoxigénica (ETEC), de adherencia difusa (DAEC), enteroinvasiva (EIEC) y enterohemorrágica (EHEC) los cuales se describirán brevemente a continuación (Yang et al. 2017; Soto Varela et al. 2016; Borriello et al., 2012).

#### **2.3.3.1 EPEC**

*E. coli* enteropatógena es uno de los principales patógenos que afecta a niños, causando diarreas, dolor abdominal, náuseas, vómito y fiebre, este microorganismo habita con frecuencia en entornos tales como alimentos o agua (Sanches et al., 2017; Yang et al. 2017). La diarrea causada por este patotipo es debido a diversos factores de virulencia, entre ellos, una proteína de membrana externa, conocida como intimina y codificada por el gen *eae* en la isla de patogenicidad denominada locus de borrado de enterocitos (LEE, por sus siglas en inglés). Este “borrado de enterocitos”, es necesario para la virulencia ya que gracias a ello produce lesiones de fijación y borrado en la célula intestinal (Yang et al. 2017).

Las cepas EPEC se han clasificado en típicas (tEPEC) y atípicas (aEPEC) identificándose gracias a la detección de los genes *eae* y *bfp* (intimina y pili formador de



haces, codificados por el plásmido EAF). Las aEPEC son consideradas así ya que no poseen el plásmido EAF, lo que lo convierte en *eae*<sup>+</sup> y *bfp*<sup>-</sup> (Sanches et al., 2017).

Las cepas EPEC son transmitidas por ruta fecal-oral y por el consumo de alimentos tales como vegetales y agua contaminada (Lee, Gwack, y Youn, 2012). Tiene la capacidad de estar presente en el medio ambiente y de adaptarse a pH alcalinos principalmente y temperaturas de 37°C (Gonzales-Siles y Sjöling, 2016).

Estudios en diferentes partes del mundo han reportado resistencia a antibióticos en cepas de EPEC en países en desarrollo y desarrollados siendo principalmente del tipo penicilinas, cefalosporinas y aminoglucósidos (Subramanian et al., 2009).

### **2.3.3.2EHEC**

*E. coli* enterohemorrágica, es uno de los patotipos que se han caracterizado por ser de las más virulentas para el humano, ya que puede afectar los vasos sanguíneos pequeños, causar la muerte de células intestinales, provocar diarrea sanguinolenta, dolor abdominal severo y como secuela, el síndrome hemolítico urémico (Blount 2015). La transmisión de EHEC se ha reportado principalmente por productos cárnicos contaminados, sin embargo, también hay casos por el consumo de productos vegetales, leche cruda y agua contaminada, o el contacto directo con animales y humanos (Yang et al. 2017; Blount 2015; Baumgartner et al.,2016). Existen diversos serotipos de estas cepas, sin embargo, el mejor documentado y conocido es el O157:H7.

Este patógeno tiene la capacidad de portar y expresar el gen *stx* el cual codifica para la producción de toxinas Shiga (*stx1* y/o *stx2*) en combinación con otros factores de virulencia que causan parte de la enfermedad. Los principales factores de virulencia son por lo tanto las toxinas Shiga, intimina, receptor de translocador de intimina (Tir), sistema de secreción de tipo III (T3SS) además de una hemolisina (*hly*) codificada en pO157 (Yang et al. 2017; Böhnlein et al., 2016).

La sintomatología que genera en el humano, es una diarrea acuosa con moco y sangre, además de dolores abdominales, fiebre, e inclusive como secuela se asocia con insuficiencia renal grave (Goldwater y Bettelheim, 2012).

El tratamiento antimicrobiano para las infecciones por EHEC sigue siendo riesgoso, debido a que el tratamiento puede causar un mayor riesgo al desarrollo de síndrome urémico hemolítico de los pacientes. Estudios informaron el aislamiento de EHEC resistente a antibióticos a partir de ganado bovino y humano (Um et al., 2018) tales como amoxicilina, ampicilina, ácido nalidíxico, gentamicina, tetraciclina, ceftriazona, ciprofloxacino, amoxicilina, ácido clavulánico, cotrimoxazol y cefixima (Bouzari et al., 2018)

#### **2.3.3.3 EAEC**

*E. coli* enteroagregativa, se describió por primera vez en 1987 y fue definida así por sus patrones de adherencia a la línea celular HEp-2. EAEC presenta diversos genes de virulencia, tales como activador transcripcional (*aggR*), fimbria de adherencia agregativa (AAF/I-AAF/IV), proteína agregante de dispersina (*aap*), dispersión en proteína transportadora (*aatA*), regulación de expresión AAF (*fis*)(*yafK*), *shf*, regulón de toxina codificada por plásmidos (*pet*), enterotoxina ShET2 y proteína involucrada en la colonización (*pic*) (Yang et al. 2017; Hebbelstrup Jensen et al. 2014). Dentro de sus etapas de patogenicidad se incluyen adherencia inicial a la superficie de la mucosa, formación de biopelículas y la inducción de una respuesta inflamatoria y liberación de toxinas (Hebbelstrup Jensen et al. 2014).

Este grupo patogénico es causante de la enfermedad conocida como diarrea del viajero, en la que la diarrea es generalmente acuosa y con moco, además de presentarse fiebre, vómitos y dolor abdominal presentándose en las primeras semanas de la exposición a este patógeno, invadiendo el sistema inmune y provocando infecciones persistentes (Okhuysen y DuPont 2010).

Cepas de EAEC se han reportado con diversa resistencia a antibióticos, tales como ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, cefotaxima, cotrimoxazol, cloranfenicol, tetraciclina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina y azitromicina en diferentes porcentajes de resistencia, identificándose el mayor porcentaje de resistencia a la ampicilina y clotrimazol (Guiral et al., 2019).

#### **2.3.3.4 ETEC**

Una de las principales causas de la diarrea a nivel mundial es la *E. coli* enterotoxigénica causante de aproximadamente 400,000,000 casos por año de diarrea en niños en países en desarrollo, también asociada con la diarrea del viajero. ETEC representa más de la mitad de los casos en los que se identifica un agente causante de enfermedades diarreicas (Walker et al. 2007; Fleckenstein, 2013)

Esta bacteria produce 2 enterotoxinas codificadas en plásmidos y conocidas como termolábil (LT) y termoestable (ST) siendo la primera expresada mayormente en presencia de glucosa. Además, se han descrito otros factores de virulencia, como adhesinas fimbriales y no fimbriales (Yang et al. 2017).

La sintomatología generada por este patotipo incluye diarrea acuosa, dolor abdominal, náuseas, vómito y fiebre, siendo los vehículos reportados agua o alimentos contaminados, mas no por transmisión de humano a humano (Fleckenstein, 2013).

Los antibióticos que se utilizan principalmente para el tratamiento contra ETEC son ciprofloxacina, doxiciclina, sulfametoxazol-trimetoprima, eritromicina, norfloxacina, ofloxacina, azitromicina y rifamicina. Sin embargo, se han reportado cepas resistentes a fluoroquinolonas y ciprofloxacina, esto último pudiera atribuirse al uso generalizado de agentes quimioterapéuticos en países donde la diarrea es endémica (Begum et al., 2016)

## 2.4 Resistencia a antibióticos

Uno de los descubrimientos más importantes en la medicina, fue la penicilina en 1928 por Sir Alexander Fleming, comenzando un gran avance en el uso de los antibióticos, sin embargo, posteriormente se empezó a reportar la resistencia a antibióticos por parte de los microorganismos (Ventola 2015), la cual se define como la capacidad que poseen las bacterias para sobrevivir en concentraciones de antibióticos que normalmente debieran ser letales para ellos (Alós 2015).

La resistencia a antibióticos se ha visto influenciada por el uso indebido de antibióticos en centros médicos, colonización previa de microorganismos con resistencias múltiples, prescripciones médicas inadecuadas, presencia de residuos de antibióticos en agua que afectarán la agricultura y acuicultura, entre otros (Cabrera et al. 2007). Todos estos factores pueden promover alteraciones genéticas en las bacterias, tales como los cambios en la expresión génica, transferencia horizontal de genes y mutagénesis (Ventola 2015). Dependiendo del tipo de antibiótico, y su mecanismo de acción, existen cuatro mecanismos de resistencia, los cuales son, eliminación activa de antibióticos de la célula mediante una bomba de eflujo, donde antibióticos como las fluoroquinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas,  $\beta$ -lactámicos y macrólidos se ven influenciados. Otro mecanismo es por la reacción de una ruta metabólica alternativa que realice una función similar inactiva por el fármaco o llegue a limitar la necesidad de la célula de metabolitos producidos en la ruta inhibida, dentro de este mecanismo se encuentra la resistencia a antibióticos como tetraciclinas, trimetoprima, sulfonamidas y vancomicina. Asimismo se reporta la capacidad de modificar el objetivo del antibiótico, donde antibióticos como fluoroquinolonas, rifamicinas, vancomicinas, penicilinas, macrólidos y aminoglucósidos se ven más afectados y por último se puede llevar a cabo la inactivación enzimática del antibiótico donde  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, macrólidos y rifamicinas presentan resistencia (Pazda et al., 2019).

Constantemente, bacterias patógenas son liberadas al ambiente a través de aguas residuales en el medio ambiente acuático. Estas bacterias pudieran poseer genes de resistencia a los antibióticos siendo capaces de propagarse entre las comunidades

bacterianas de agua y del suelo. En estos ecosistemas, las bacterias que son patógenas podrían servir como un depósito de genes y plataformas de resistencia a antibióticos (Baquero et al., 2008). Al estar presentes bacterias con genes de resistencia a antibióticos en el ambiente, pueden diseminarse fácilmente en el uso de aguas residuales para el riego de productos vegetales, causando así la contaminación de diversos productos (Cabrera et al. 2007)

Las bacterias presentes en el agua pueden ser autóctonas de los ambientes acuáticos, o exógenas y transitorias y suelen estar presentes en el agua debido a desprendimiento de las superficies animales, vegetales o del suelo. Diversos estudios han demostrado que más del 90% de las bacterias originadas en el agua de mar son resistentes a más de un antibiótico y el 20% son resistentes al menos a cinco (Baquero et al., 2008).

Uno de los mecanismos más significativos para que las bacterias adquieran la resistencia a antibióticos es debido a la transferencia horizontal de genes, además de la absorción del ADN extracelular (Burmeister 2015). La transferencia horizontal de genes, es definida como el movimiento de información genética entre organismos, promoviendo en ciertos casos la resistencia a los antibióticos. Este proceso ocurre mediante tres mecanismos genéticos:

- 1) Transformación: capacidad que tienen las bacterias de tomar el ADN de su entorno que le permitan integrarse adecuadamente en el genoma del huésped.
- 2) Conjugación: las bacterias tienen la capacidad de transferir genes directamente a otra célula (Burmeister 2015) mediante un pili de superficie celular o adhesivo conocido como pili sexual. Investigadores identificaron por primera vez el “el factor R” como factor de resistencia y el “factor F” como el pili sexual, el cual es capaz de diseminar la resistencia (Lood, Ertürk, y Mattiasson, 2017) mediante una maquinaria conjugativa codificada por genes en plásmidos que se replican autónomamente o por elementos conjugativos integrados al cromosoma, los cuales, cual a su vez cuenta con la capacidad de conferir movilidad de plásmidos que no son conjugativos (von Wintersdorff et al. 2016). Los plásmidos proporcionan una gran cantidad de determinantes resistentes a muchos de los

antibióticos existentes, entre los cuales se encuentran los aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas, glicopéptidos, fluoroquinolonas y  $\beta$ -lactamasas (Barlow 2009).

- 3) Transducción: es el proceso mediante el cual se lleva a cabo la transferencia de genes, mediada por bacteriófagos (virus que infectan bacterias) por lo que dicho proceso se encuentra limitado a ciertos huéspedes. Gracias a los bacteriófagos tienen la capacidad de transferir genes ventajosos para sus huéspedes microbianos, promoviendo la supervivencia y diseminación. Dichas secuencias de ADN transferibles varían en ADN cromosómico a elementos génicos movibles, como plásmidos, transposones e islas genómicas (von Wintersdorff et al. 2016; Kelly et al. 2009).

Dada lo anterior y que las aguas de riego representan un vehículo importante para la transmisión de patógenos a los productos vegetales y que posiblemente éstos pudieran poseer genes de resistencia a antibióticos, en el presente trabajo nos dimos a la tarea de buscar bacterias patógenas en este tipo de agua y la determinación de los genes de virulencia y resistencia a antibióticos de los aislados, lo cual nos ayudará a conocer si estos microorganismos están presentes en el entorno agrícola de ciertas huertas de nuestro país.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Se han identificado diversas fuentes de contaminación en productos hortofrutícolas, ya sea antes, durante y/o después de la cosecha, entre las que se mencionan, la manipulación, los animales cercanos a la cosecha, el suelo, el agua de riego, y las condiciones medioambientales entre otros. Muchos de los campos o huertas son regadas con aguas no tratadas, o bien, pueden encontrarse cerca de ríos de aguas residuales, lo cual puede ser un factor de contaminación importante en los productos vegetales, debido a la presencia de microorganismos patógenos en dichas aguas.

Actualmente el uso de antibióticos en diversas áreas incluyendo el agrícola ha ido en aumento lo cual pudiera facilitar la adquisición de resistencia a los mismos por parte de bacterias presentes de dicho ambiente, sean patógenas o no. Dicha adquisición de resistencia pudiera realizarse a través de elementos genéticos móviles tales como transposones, plásmidos o integrones o bien por mecanismo horizontal de genes. Si las bacterias adquieren genes de resistencia a antibióticos o genes relacionados a la virulencia bacteriana pudieran funcionar como reservorios de los mismos, incrementando con esto el riesgo de alguna enfermedad al consumir productos agrícolas contaminados con estos.

De igual manera, el origen de aguas de riego tiene como procedencia diversas fuentes, tales como hospitales, restaurantes, hogares, etc. conteniendo heces tanto animales como humanos y posibles desechos de antibióticos, contribuyendo esto a que los microorganismos obtengan resistencia a antibióticos y/o virulencia presentes en el medio.

Por lo tanto, en el estudio se pretende identificar microorganismos patógenos procedentes de aguas de riego, así como genes de virulencia y resistencia a antibióticos.

#### **4. HIPÓTESIS**

Existen microorganismos patógenos presentes en agua de riego de diversas zonas de México (Chihuahua, Puebla y Veracruz), los cuales poseen genes de virulencia, resistencia a antibióticos y sus genes.



## **5. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Aislar e identificar microorganismos patógenos por sus genes de virulencia, determinación de su resistencia a antibióticos y sus genes a partir de muestras de aguas que irrigan diversas huertas en zonas agrícolas de México (Chihuahua, Puebla y Veracruz).

### **Objetivos específicos**

- Aislar e identificar microorganismos patógenos en aguas que irrigan huertas en los estados de Chihuahua, Puebla y Veracruz.
- Identificar la presencia de genes de factores de virulencia bacterianos en los microorganismos aislados de aguas de irrigación de los estados de Chihuahua, Puebla y Veracruz.
- Analizar la resistencia fenotípica a diferentes antibióticos en los microorganismos patógenos identificados a partir de aguas de irrigación de los estados de Chihuahua, Puebla y Veracruz.
- Analizar la presencia de genes de resistencia a antibióticos en los microorganismos patógenos identificados en aguas de irrigación de los estados de Chihuahua, Puebla y Veracruz.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Área de trabajo

El proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

### 6.2 Recolección de muestras

La recolección de muestras se realizó en tres zonas distintas del país: Veracruz, Chihuahua y Puebla en los meses de Abril, mayo y junio del 2019 respectivamente., donde se muestreó agua de riego en diferentes huertas. Fueron un total de 10 muestras de diferentes áreas por zona por estado, se colectaron botellas estériles de 500 ml y se transportaron al laboratorio en hielo para ser procesadas.

### 6.3 Procesamiento de muestras

#### 6.3.1 Aislamiento e Identificación de microorganismos patógenos en agua de riego.

Una vez en el laboratorio, las muestras de agua, se procesaron para el aislamiento e identificación de bacterias patógenas como: *Salmonella* spp, *Enterococcus* spp y patotipos de *E. coli* (EHEC, ETEC, EPEC, EAEC).

#### *Salmonella* spp

Para su aislamiento se tomaron 0.5ml de cada muestra y se inocularon en 5ml de caldo de pre-enriquecimiento universal (UPEB, BD, México) para ser incubados durante 24 h a 37°C, posteriormente, de este cultivo se tomaron 50µl y se inocularon en 5 ml de caldo Rapaport-Vassiliadis (BD, México) incubándose de nuevo por 24 h a 42°C. Pasado el tiempo de incubación, de cada cultivo se tomó una asada la cual se estrío en cuatro cuadrantes en agar xilosa lisina desoxicolato (XLD, BIOXON, México) por 24h a 37°C. Se observó el crecimiento bacteriano y se seleccionaron hasta cinco colonias presuntivas de *Salmonella* spp (las cuales de acuerdo a la NORMA Oficial Mexicana NOM-210-

SSA1-2014, se consideraron las colonias negras, con o sin centro negro y medio amarillo como colonias típicas y colonias incoloras con medio rojo-naranja como colonias atípicas) para confirmarse por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) descritas posteriormente.

### ***Enterococcus spp***

De la muestra se inocularon 0.5ml en 5 ml de caldo azida dextrosa incubándose a 37°C durante 24h. Posteriormente se tomó una asada de este cultivo y se sembraron por estría en cuatro cuadrantes en agar KF *Streptococcus* (ACUMEDIA, USA) suplementado con TTC 1% para ser incubadas por 24h a 37°C. Se observó el crecimiento bacteriano y se seleccionaron hasta cinco colonias presuntivas siendo éstas de color rojo-naranja con agar amarillo, para ser confirmadas por la técnica de PCR.

### ***E. coli***

Para el aislamiento de *E. coli* y su posterior identificación de patotipos, se tomó una alícuota de 0.5ml de la muestra original, y se inocularon en 5ml de caldo triptona fosfato (BIOXON, México) y se incubó a 44°C por 20 h. De dicho cultivo se tomó una asada que se estrío en diferentes agares tales como MacConkey (MCK, BIOXON, México), MacConkey-Sorbitol (SMAC, BD, México) y Eosina azul de metileno (EMB, BIOXON, México). Las placas se incubaron por 24h a 37°C y pasado el tiempo de incubación se seleccionaron hasta cinco colonias presuntivas de *E. coli* de cada medio. Para el caso del medio MCK y EMB las colonias presuntivas eran de color rosa para el primero y colonias verde con brillo metálico para el segundo, en tanto que en medio SMAC las presuntivas de EHEC son incoloras. Después de la selección de colonias presuntivas se confirmaron por la técnica de PCR.

## **6.4 Confirmación de aislados por detección de genes de virulencia**

### **6.4.1 Extracción de DNA a partir de los aislados obtenidos**

Se realizó siguiendo la metodología propuesta por Wang et al., (1997) para lo cual, cada aislado fue inoculado en caldo soya tripticasa (BD) y después de incubado por 24h a

37°C, se tomó una alícuota de 0.5ml el cual se homogenizó con 1ml de una solución amortiguadora de fosfatos (PBS 0.05mol/L, pH 7.4) en tubos de 2ml (Eppendorf) y se centrifugó a 9000xg durante 3 min (Centrifuge 5415 C Eppendorf). El precipitado obtenido se resuspendió en 50µl de agua milipura (miliQ). Las muestras se diluyeron 1:10 con tritón X-100 (Sigma) al 1% para calentarse a 95-100°C durante 10 min. Posteriormente se enfrió inmediatamente en baño de agua con hielo. De allí se tomó el DNA que sirvió como templado para la amplificación.

#### **6.4.2 Detección de genes por PCR punto final**

La confirmación de los aislados de *Salmonella* y *Enterococcus* spp se realizó mediante la metodología propuesta por Wang et al. (1997) con breves modificaciones, como a continuación se describe. El volumen final de reacción fue de 25µl los cuales consistieron en 0.2U Taq (BIOLINE, USA), 5µl de buffer 5X Mytaq reaction buffer (BIOLINE), 0.24µM de cada oligonucleótido (Tabla 1) y 2µl del ADN templado. La amplificación se realizó en un termociclador Termohybayd veriti 96 (Well Thermal Cycler) bajo condiciones de amplificación de un ciclo de 94°C por 15s, seguidas de 35 ciclos de 94°C por 3 s, 50°C por 10 s y 74°C por 35 s, seguido de un ciclo de 74°C por 2 min y por último un ciclo de 45°C por 2 s.

Para el caso de la confirmación de los patotipos de *E. coli* (EHEC, EPEC, ETEC, EAEC), se realizó siguiendo el protocolo de Vidal et al., 2005 para lo cual se mezclaron 1U taq, 5µl de buffer 5X mytaq reaction buffer (BIOLINE), y 0.1µM para los oligonucleótidos (Tabla 1) *stx1*, *stx2*, *eae* y *bfp*, en tanto que para *aafII* y *lt* se agregaron 0.5µM y 3µl de ADN templado para un volumen final de reacción de 25µl. Las condiciones de amplificación fueron de 1 ciclo de 94°C durante 30 s seguidos de 35 ciclos, los cuales consistieron en 1.5 min a 94°C para la desnaturalización, 1.5 min a 60°C para la alineación y 1.5 min a 72°C para la elongación.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados y sus genes blanco

Factor de virulencia	Bacteria	Gen blanco	Secuencia 5'-3'	Tamaño del producto (pb)	Referencia	
Invasión	<i>Salmonella enterica</i>	<i>invA</i>	TATCGCCACGTTTCGGGCAA TCGCACCGTCAAAGGAACC	275	Wang et al. 1997	
Toxinas	EHEC	<i>Stx1</i>	CAGTTAAGTGGTGGCGAAGG CACCAGACAATGTAACCGCTG	348	Vidal et al. 2005	
		<i>Stx2</i>	ATCCTATTCGCCGGGAGTTTACG GCGTCATCGTATACACAGGAGC	584		
		<i>eae</i>	TCAATGCAGTTCCGTTATCAGTT GTAAAGTCCGTTACCCCAACCTG	482		
	EPEC	<i>lt</i>	GTAGGGAAGCGAACAGAG AAGCTCCGTGTGCCTGAA	361		
Adhesión	EPEC	<i>bfp</i>	GGAAGTCAAATTCATGGGGGTAT GGAATCAGACGCAGACTGGTA	300	Dupré et al. 2003	
	EAEC	<i>aafl</i>	CACAGGCAACTGAAATAAGTCTGG ATCCCATGATGTCAAGCACTTC	378		
	EPEC	<i>eae</i>	TCAATGCAGTTCCGTTATCAGTT GTAAAGTCCGTTACCCCAACCTG	482		
	<i>Enterococcus spp</i>	<i>efaA</i>	CGTGAGAAAGAAATGGAGGA CTACTAACACGTCACGAATG	499		Albriouel et al. 2008
		<i>ccf</i>	GGAATTGAGTAGTGAAGAAG AGCCGCTAAAATCGGTAAAAT	543		Strateva et al. 2015
<i>eda</i>		GGGGACAGTTTTGGATGCTA TCCATATAGGCTTGGGCAAC	404			
Gelatinasa		<i>gelE*</i>	ACGCATTGCTTTCCATC ACCCCGTATCATTGGTTT	419	Comerlato et al., 2013	

\* Específico para *E. faecalis*

### 6.5 Identificación de resistencia a antibióticos.

Se realizó la determinación de resistencia o susceptibilidad a antibióticos a los aislados identificados como patógenos, para lo cual se seleccionaron diferentes antibióticos, como representantes de grupos de los diferentes antibióticos buscados (Tabla 2). A los aislados confirmados se les determinó su resistencia a antibióticos para lo cual, por una parte se inocularon 10µl por estría de un cultivo previamente ajustado al tubo 0.5 de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/ml) sobre agar Mueller Hinton (MH, Bioxon, México) adicionado con diferentes antibióticos: ampicilina (10 µg/ml), vancomicina (6 µg/ml), eritromicina (30 µg/ml), polimixina B (30 µg/ml), colistina (4 µg/ml), ciprofloxacina (5

$\mu\text{g/ml}$ ), Trimetoprima ( $25 \mu\text{g/ml}$ ) y tetraciclina ( $30 \mu\text{g/ml}$ ). Y por otro lado, se realizó la técnica de Kirby Bauer para lo cual el cultivo ajustado a  $1 \times 10^6$  UFC/ml fue inoculado por extensión sobre agar MH sin antibiótico. Después de la siembra se colocaron los sensidiscos (OXOID, México) siguientes: ampicilina ( $25 \mu\text{g/ml}$ ), eritromicina ( $15 \mu\text{g/ml}$ ), cefotaxima ( $30 \mu\text{g/ml}$ ) y sulfametoxazol/trimetoprima ( $25 \mu\text{g/ml}$ ).

Todas las placas se incubaron 24h a  $37^\circ\text{C}$  y pasado el tiempo de incubación se determinó la susceptibilidad o resistencia de los microorganismos mediante el crecimiento a ausencia de éste cuando se sembraron por estría, y para el caso de los sensidiscos las mediciones de los halos se llevó a cabo de acuerdo al Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tomando en cuenta lo siguiente: ampicilina: sensible  $\geq 17\text{mm}$ , intermedio 14-17mm, resistente  $\leq 13\text{mm}$ ; Eritromicina: sensible  $\geq 23\text{mm}$ , intermedio 14-22mm, resistente  $\leq 13\text{mm}$ ; Cefotaxima:  $\geq 26 \text{ mm}$ , intermedia 23-25mm, resistente  $\leq 22 \text{ mm}$ ; Sulfametoxazol/trimetoprima: sensible  $\geq 16 \text{ mm}$ , intermedio 11-15 mm, resistente  $\leq 10\text{mm}$ .

## **6.6 Identificación de genes resistencia a antibióticos.**

A cada aislado confirmado se les realizó la búsqueda de genes de resistencia a antibióticos utilizando oligonucleótidos específicos (Tabla 2) para grupo de antibióticos comúnmente empleados en la clínica.

Para ello, a partir de la extracción de ADN arriba descrita, un volumen de  $2 \mu\text{l}$  se homogenizó con  $18 \mu\text{l}$  de la mezcla de reacción la cual contenía 0.2U taq,  $5 \mu\text{l}$  de buffer 5X mytaq reaction buffer (Bioline, USA) y  $10 \mu\text{M}$  de cada oligonucleótido. La amplificación se realizó en un termociclador (veriti 96 Well Thermal Cycler) y los ciclos de amplificación consistieron de un ciclo de  $94^\circ\text{C}$  por 5 min seguido de 35 ciclos, comprendidos de 30s a  $94^\circ\text{C}$  para la desnaturalización, 30s a diferentes temperaturas acorde a cada oligonucleótido (Tabla 2) para la alineación y 30s a  $72^\circ\text{C}$  para la elongación y finalizar con un ciclo de 5 min a  $72^\circ\text{C}$ .

Tabla 2. Genes de resistencia a antibióticos.

Grupo de antibióticos	Antibiótico representativo	Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Temperatura alineación (°C)	Tamaño del producto (pb)	Referencia
β - lactámicos	Ampicilina Cefotaxima	<i>blaCARB-4</i>	TAATAAGAAAAGCAAGTAGG A AACTATGATTGGGGATTGAG	50	435	Marti et al. 2013
		<i>blaOXA-5</i>	AGCCGCATATTTAGTTCTAG ACCTCAGTTCCTTTCTCTAC	51	663	
		<i>BlaSHV</i>	GGTTATGCGTTATATTCGCC TTAGCTTTGCCAGTGCTC	56	867	
		<i>Ctxm-1</i>	GGTAAAAAATCACTGCGTC TTGGTGACGATTTTAGCCGC	54	863	Garrec et al. 2011
		<i>AmpC</i>	GGAATGCTGGATGCACAA CATGACCCAGTTCGCCATATC	54	643	Bockelman et al. 2009
Tetracinas	Tetraciclina	<i>tetA</i>	GCGGTCTTCTTCATCATGC CGGCAGGCAGAGCAAGTAGA	56	502	
		<i>tetB</i>	CATTAATAGGCGCATCGCTG TGAAGTTCATCGATAGCAGG	55	930	
Macrólidos	Eritromicina	<i>ermA</i>	GTTCAAGAACAATCAATACAG AG GGATCAGGAAAAGGACATTTT AC	50	421	Marti et al. 2013
		<i>ermB</i>	CCGTTTACGAAATTGGAACAG GTAAAGGC GAATCGAGACTTGAGTGTGC	58.4	359	
		<i>ermF</i>	TCGTTTTACGGGTCAGCACTT CAACCAAAGCTGTGTCGTTT	53	180	Schmidt et al. 2015
Sulfonamidas	Sulfametoxazol/trimetoprima	<i>SulI</i>	GTGAACGGTGTTTCGGCATTCT TCCGAGAAGGTGATTGCGCT	60.4	779	Marti et al. 2013
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	<i>qnrA</i>	ATTTCTCACGCCAGGATTTG GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	55	516	
Polimixinas	Polimixina B Colistina	<i>Mcr-1</i>	GCAGCATACTTCTGTGTGGTA C TATGCACGCGAAAGAACTGG C	55	309	Chabou et al. 2016
Glicopéptidos	Vancomicina	<i>vanB</i>	GTGACAAACCGGAGGCGAGG A CCGCCATCCTCCTGCAAAAAA	56	433	Telebi et al. 2015

Integrinas		<i>IntI</i>	CCTCCCGCACGATGATC TCCACGCATCGTCAGGC	56	280	Marti et al. 2013
		<i>IntII</i>	TTATTGCTGGGATTAGGC ACGGCTACCCTCTGTTATC	51.3	233	
		<i>IntIII</i>	AGTGGGTGGCGAATGAGTG TGTGTGTGTATCGGCAGGTG	57	600	
Plásmidos		<i>oriV</i>	CTCCCGTACTAACTGTCACG ATCGACCGAGACAGGCCCTGC	58.3	436	
		<i>oriT</i>	TTCGCGCTCGTTGTTCTTCGAG C GCCGTTAGGCCAGTTTCTCG	56	191	

Los amplificadores fueron visualizados mediante un gel de agarosa 1.5 % teñido con GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (1X) y fotografiado bajo luz UV utilizando un fotodocumentador (Gel logic 200 Imaging System, Kodak).



## **7. RESULTADOS**

El aislamiento e identificación de microorganismos patógenos se realizó a partir de 10 muestras de aguas que irrigan cultivos de tres estados de México (Chihuahua, Puebla y Veracruz) obteniendo un total de 30 muestras.

Los muestreos se realizaron en diferentes periodos del año 2019, Veracruz se realizó durante la primer semana de Abril, Chihuahua la primer semana de Mayo y finalmente Puebla se realizó en la segunda semana de Junio, en cada uno de los cuales se consideró la ubicación geográfica y la procedencia (Tabla 3).

Tabla 3. Zona y procedencia de las muestras

Estado	Muestra	Ubicación geográfica	Procedencia de muestra
Veracruz	1	19°03'41''N - 098°57'31'' W	Río
	2	19°04'316 N - 097°04'587''W	Río
	3	19°04'646''N- 097°03'231''W	Río
	4	19°05'023''N - 097°02'669'' W	Río
	5	19°04'000''N - 097°01'463'' W	Río
	6	19°02'212''N - 096°57'159'' W	Río
	7	19°01'625''N - 096°59'986'' W	Río
	8	19°00'358''N - 097°02'572'' W	Río
	9	19°00'279''N - 097°01'081'' W	Río
	10	19°02'722''N - 097°02'454'' W	Río
Chihuahua	1	26°58'13''N - 105°10'4''O	Pozo
	2	26°59'7''N - 105°3'30''O	Presa
	3	27°0'0''N - 105°1'52''O	Noria
	4	28°10'8''N - 105°28'58''O	Presa
	5	28°13'12''N - 105°32'21''O	Presa
	6	28°16'5''N - 105°32'52''O	Presa
	7	28°19'30''N - 105°32'44''O	Presa
	8	28°23'6''N - 105°33'28''O	Presa
	9	28°9'5''N - 105°36'3''O	Presa
	10	28°7'54''N - 105°27'12''O	Presa
Puebla	1	18°56'14''N - 98°8'35''O	Lago
	2	18°55'22''N - 98°8'1''O	Lago
	3	18°55'19''N - 98°8'7''O	Lago
	4	18°56'9''N - 98°8'6''O	Lago
	5	18°55'21''N - 98°8'17''O	Lago
	6	18°55'25''N - 98°10'25''O	Lago
	7	18°54'34''N - 98°10'4''O	Lago
	8	18°54'3''N - 98°10'1''O	Lago
	9	18°54'3''N - 98°10'1''O	Lago
	10	18°54'21''N - 98°10'35''O	Lago

### 7.1. Aislamiento de microorganismos patógenos en agua de riego.

De las muestras obtenidas de los 3 estados, después de realizar el enriquecimiento en caldos de cultivo y el aislamiento en agares específicos, se logró el aislamiento de máximo cinco colonias presuntivas de cada microorganismo obteniéndose un total de 496 aislados presuntivos de todos los microorganismos siendo Puebla el estado con más

aislados presuntivos, seguido de Veracruz y Chihuahua con 200, 181 y 115 aislados respectivamente.

Con respecto a los aislados presuntivos de *Salmonella* spp de todas las muestras, se obtuvieron un total de 34 (6.85%) aislados (colonias rosas con o sin centro negro, rosa salmón o amarillas con o sin centro negro) a partir del agar XLD (Fig. 1). En el caso de *Enterococcus* spp a partir del agar KF *Streptococcus* se encontraron 82 (16.53%) aislados con características presuntivas en coloración rojo ladrillo y agar amarillo, mientras que para las *E. coli*, a partir de agar EMB y MCK se seleccionaron un total de 240 (48.38%) aislados presuntivos siendo colonias de color negro azulado con brillo verde metálico y colonias de color rosa respectivamente. Al utilizar el agar SMAC presuntivamente las colonias típicas de EHEC corresponde a las incoloras o beige logrando un total de 140 (28.23%), (Fig. 1). Derivado de todo ello, obtuvimos un total de 496 aislados presuntivos de los microorganismos patógenos para su posterior confirmación.



Figura 1. Colonias presuntivas de los microorganismos. 1. *Salmonella* spp agar XLD; 2. *Enterococcus* spp en agar KF *Streptococcus*; 3. EHEC en agar SMAC; 4. EHEC y otras *E. coli* en SMAC; 5. *E. coli* en EMB.

De acuerdo con los datos obtenidos se encontró un mayor crecimiento bacteriano de colonias presuntivas en el estado de Puebla con un total de 200 (40.32%), seguido de Veracruz con 181 (36.49%) y en menos cantidad en Chihuahua con 115 (23.18%) de colonias presuntivas de microorganismos patógenos buscados.

Con respecto a los aislados presuntivos de *Salmonella* spp, de los 34 (6.85%), se encontró un mayor aislamiento de colonias presuntivas de Puebla con 20 (58.9%), seguido de Veracruz con 9 (26.5 %) y en Chihuahua con 5 (14.7%) (Tabla 4).

Para el caso de *Enterococcus* spp, de los 82 (16.5%) se encontró en mayor número de aislados presuntivos a partir de las muestras provenientes de Puebla con 40 (48.8%), seguido de Veracruz y Chihuahua con 37(45.1%) y 5 (6.1%) respectivamente (Tabla 4).

En cuanto a *E. coli*, las colonias presuntivas de EHEC, del total de 140 (28.2%) se encontraron mayormente a partir de muestras del estado de Puebla con 50 (35.7%), seguido de Chihuahua y Veracruz en las cuales se encontraron 45 (32.1%) aislados presuntivos por estado (Tabla 4).

Por último, los patotipos EPEC, ETEC y EAEC al tener un crecimiento similar en los agares selectivos se seleccionaron a partir de dos agares diferentes (EMB y MCK) y de los 240 (48.4%) se encontró un mayor aislamiento a partir de las muestras de Puebla y Veracruz con 90 (37.5%) colonias presuntivas en cada estado seguido de Chihuahua, con 60 (25%) colonias presuntivas (Tabla 4).

Tabla 4. Aislados presuntivos de los microorganismos patógenos en los estados de Chihuahua Puebla y Veracruz.

Bacteria	Estado	Colonias Presuntivas n (%)
<i>Salmonella</i> spp	Chihuahua	5 (14.7)
	Puebla	20 (58.9)
	Veracruz	9 (26.5)
	Total (n/N)	34/496 (6.85)
<i>Enterococcus</i> spp	Chihuahua	5 (6.1)
	Puebla	40 (48.8)
	Veracruz	37 (45.1)
	Total (n/N)	82/496 (16.5)
EHEC*	Chihuahua	45 (32.1)
	Puebla	50 (35.7)
	Veracruz	45 (32.1)
	Total (n/N)	140/496 (28.2)
EPEC, ETEC, EAEC**	Chihuahua	60 (25)
	Puebla	90 (37.5)
	Veracruz	90 (37.5)
	Total (n/N)	240/496 (48.4)
Total (N)		496

\* aislados de SMAC, \*\* aislados de EMB, MCK

Con respecto a las muestras propiamente, se logró el aislamiento de colonias presuntivas a partir de 30 muestras de agua de riego de diferentes huertas en los diferentes estados, en donde se presentó el crecimiento presuntivo mínimo de un microorganismo buscado en cada una de las muestras, a excepción de la muestra 3 de Chihuahua procedente de noria y la muestra 2 de Veracruz, procedente de río en las que no hubo aislamiento presuntivo (Tabla 5)

Tabla 5. Aislamientos presuntivos procedentes de cada muestra en los diferentes estados.

Aislados Presuntivos de Chihuahua (115)					
Muestra	Procedencia	<i>Salmonella</i> spp	<i>Enterococcus</i> spp	EHEC	ETEC, EPEC EAEC
1	Pozo	0	0	5	0
2	Presa	0	0	5	10
3	Noria	0	0	0	0
4	Presa	0	0	5	0
5	Presa	0	0	5	0
6	Presa	0	0	5	10
7	Presa	0	5	5	10
8	Presa	5	0	5	10
9	Presa	0	0	5	10
10	Presa	0	0	5	10
Total		5	5	45	60
Aislados Presuntivos de Puebla (200)					
Muestra	Procedencia	<i>Salmonella</i> spp	<i>Enterococcus</i> spp	EHEC	ETEC, EPEC EAEC
1	Lago	3	5	5	10
2	Lago	0	5	5	10
3	Lago	2	0	5	10
4	Lago	4	0	5	10
5	Lago	1	5	5	10
6	Lago	2	5	5	10
7	Lago	1	5	5	10
8	Lago	3	5	5	10
9	Lago	4	5	5	0
10	Lago	0	5	5	10
Total		20	40	50	90

Aislados Presuntivos de Veracruz (181)					
Muestra	Procedencia	<i>Salmonella</i> spp	<i>Enterococcus</i> spp	EHEC	ETEC, EPEC EAEC
1	Río	0	5	5	10
2	Río	0	0	0	0
3	Río	0	5	5	10
4	Río	3	4	5	10
5	Río	0	3	5	10
6	Río	0	5	5	10
7	Río	0	5	5	10
8	Río	1	5	5	10
9	Río	5	5	5	10
10	Río	0	0	5	10
Total		9	37	45	90

## 7.2 Confirmación de aislados

A partir de los 496 aislados presuntivos de los patógenos buscados para su confirmación se les buscó la presencia de genes de virulencia específicos para los patógenos, de los cuales, de los 82 aislados presuntivos de *Enterococcus* spp se logró la confirmación de dos aislados (2.4%) provenientes de únicamente de la muestra No 3 de Veracruz, que al intentar identificar específicamente como *E. faecalis* mediante la búsqueda de gen *gelE* específico de dicha especie, ninguna fue positiva, quedando por lo tanto solo como *Enterococcus* spp (*eda*<sup>+</sup>).

Para el caso de los 380 aislados presuntivos de *E. coli* (EHEC, EPEC, ETEC EAEC), se logró la confirmación de un total de 6 aislados de *E. coli* patogénica en total, de los cuales 3 son procedentes de muestras de Veracruz y 3 de muestras de Puebla. En caso de Veracruz la muestra No 3 se obtuvieron 3 aislados (2 tEPEC y 1 aEPEC), en tanto que de Puebla la muestra No 1 y 4 tuvieron cada una 1 aEPEC. Las cepas tEPEC se consideran *eae*<sup>+</sup>, *bfp*<sup>+</sup> y las aEPEC como *eae*<sup>+</sup>, *bfp*<sup>-</sup>.

En total, 8 aislados fueron confirmados como patógenos representado un 1.61% (8/496) de los presuntivos fenotípicamente (Tabla 6), siendo Veracruz el estado con la mayor

presencia de microorganismos patógenos (5/8, 62.5%), seguido de Puebla con (2/8, 37.5%) y por último Chihuahua donde no se encontró la presencia de los microorganismos patógenos aquí buscados.

Tabla 6. Microorganismos patógenos confirmados a partir de muestras de agua de riego

Estado	Bacteria	Presuntivas	Confirmadas	% de Confirmados	Total de Bacterias confirmadas (%)
Veracruz	<i>Salmonella</i> spp	9	0	0	5 (62.5)
	<i>Enterococcus</i> spp	37	2	2.44	
	EHEC	45	0	0	
	EPEC, ETEC, EAEC	90	3	1.25	
Chihuahua	<i>Salmonella</i>	5	0	0	0 (0)
	<i>Enterococcus</i> spp	5	0	0	
	EHEC	45	0	0	
	EPEC, ETEC, EAEC	60	0	0	
Puebla	<i>Salmonella</i>	20	0	0	3 (37.5)
	<i>Enterococcus</i> spp	40	0	0	
	EHEC	50	0	0	
	EPEC, ETEC, EAEC	90	3	1.25	

### 7.3. Resistencia a Antibióticos

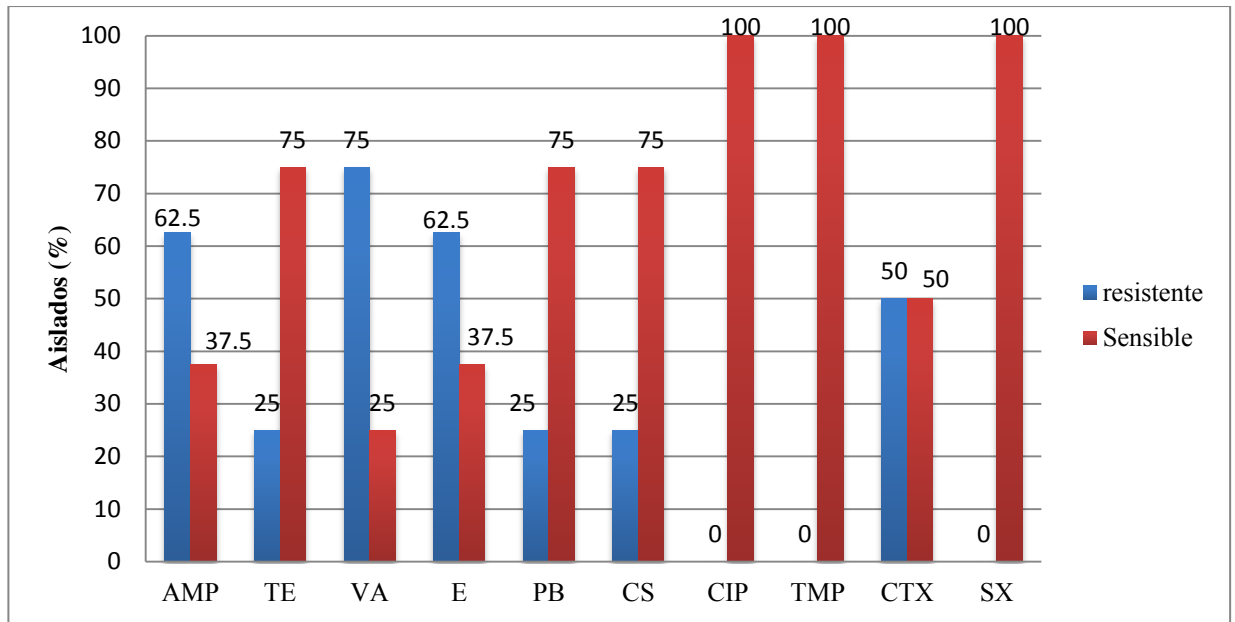
Una vez identificados los aislados presuntivos, se les determinó a los ocho aislados confirmados su patrón de sensibilidad o resistencia frente a diversos antibióticos, de los cuales se identificó la resistencia al menos un antibiótico de los diez probados en todos los aislados (Tabla 7), siendo la vancomicina el antibiótico al que más aislados fue resistente (6/8, 75%) encontrándose además todos los aislados de *E. coli* como resistentes a dicho antibiótico. En cuanto a la polimixina B y colistina (2/8, 25%) únicamente se encontró la resistencia en los aislados de *Enterococcus* spp. Todos los aislados fueron sensibles a trimetoprima, ciprofloxacino y sulfametoxazol/trimetoprima (Tabla 7, Fig. 2).

Tabla 7. Resistencia a antibióticos en los aislados patógenos

AISLADO										
ANTIBIÓTICO	Conc. (µg/ml)	<i>Enterococcus</i> M3-1 Veracruz	<i>Enterococcus</i> M3-3 Veracruz	aEPEC M3-2 Veracruz	tEPEC M3-1 Veracruz	tEPEC M3-5 Veracruz	aEPEC M1-5 Puebla	aEPEC M4-2 Puebla	EPEC M7-2 Puebla	R (%) S (%)
Ampicilina	10	S	S	S	R	R	R	R	R	R=62.5 S=37.5
Tetraciclina	30	S	S	R	S	S	S	S	S	R=25 S=75
Vancomicina	6	S	S	R	R	R	R	R	R	R=75 S=25
Eritromicina	30	S	S	R	R	R	R	S	R	R=62.5 S=37.5
Polimixina B	30	R	R	S	S	S	S	S	S	R=25 S=75
Colistina	4	R	R	S	S	S	S	S	S	R=25 S=75
Ciprofloxacina	5	S	S	S	S	S	S	S	S	R=0 S=100
Trimetoprima	25	S	S	S	S	S	S	S	S	R=0 S=100
Cefotaxima	30	R	R	S	S	S	R	R	S	R=50 S=50
Sulfametoxazol / trimetoprima	25	S	S	S	S	S	S	S	S	R=0 S=100
		R=30 (30%) S=70 (70%)	R=30 (30%) S=70 (70%)	R=30 (30%) S=70 (70%)	R=30 (30%) S=70 (70%)	R=30 (30%) S=70 (70%)	R=30 (30%) S=70 (70%)	R=30 (30%) S=70 (70%)	R=30 (30%) S=70 (70%)	R=30 (30%) S=70 (70%)

Conc: concentración, M: muestra, R: resistente, S: sensible





AMP= Ampicilina, TE= Tetraciclina, VA= Vancomicina, E= Eritromicina, PB= PolimixinaB, CS=Colistina, CIP= Ciprifloxacino, TMP= Trimetoprima, CTX= Cefotaxima SX= Sulfametoxazol/ trimetoprima

Figura 2. Porcentaje de resistencia y sensibilidad a antibióticos entre los aislados confirmados.

#### 7.4 Genes de resistencia a antibióticos

A partir de 8 aislados confirmados procedentes de aguas de riego de Veracruz y Puebla se les realizó la búsqueda de 19 genes de resistencia a antibióticos, de los cuales únicamente en un aislado de ETEC procedente de la muestra No 7 de Puebla se identificó el gen *tetA* el cual codifica para la resistencia a tetraciclinas.

## 8. DISCUSIÓN

La producción agropecuaria representa un papel importante en la economía mexicana, de acuerdo con la organización mundial de comercio (OMC) México se encuentra entre las 10 mayores economías exportadoras de productos agroalimentarios incluyendo productos como aguacate, jitomate, chile, fresas y frambuesas (Morales 2019)

Los ETAs son un problema a nivel mundial y son generadas por el consumo de alimentos contaminados con microorganismos patógenos y/o sus toxinas. Dentro de estos productos se encuentran los diversos frutos y vegetales, los cuales están en riesgo constante de contaminación, debido a diversos factores, como el tipo de producto, la variedad y el estado fisiológico de la planta, el patógeno y sus condiciones de adaptación en el ambiente, así como el suelo, la manipulación por piscadores y el agua de riego (Critzler y Doyle, 2010).

Con respecto a las rutas de contaminación, Alegbeleye et al. (2018) realizaron un análisis y recopilación de las diversas rutas de productos vegetales, donde encontraron que las causas de contaminación son variables según las diferentes zonas de producción, ya que cada huerta cuenta con distintos factores de riesgo, la topografía, la interacción con el tipo de suelo en la región, el clima, el agua de riego, el uso de estiércol para abono, así como la vida silvestre presente. Heredia et al. (2016) analizaron indicadores microbianos en productos como melón, chile jalapeño y tomate, además de muestras ambientales (manos, suelo y agua) de huertas en el norte de nuestro país. En este caso, las muestras de las huertas de melón tenían niveles de indicadores más altos en el producto (6.5, 2.8 y 7.2 log UFC por fruta) y manos (6.6, 3.1 y 7.1 log UFC por mano) para coliformes, *E. coli* y *Enterococcus*, respectivamente, y niveles más bajos de *E. coli* en el suelo (<1 UFC/g). En el caso de *E. coli* en agua fue más prevalente muestras de huertas de tomate (70 a 89% de las muestras fueron positivas).

Teniendo en cuenta la importancia que tiene la producción agrícola en México y el problema a nivel mundial de las ETAs, en el presente estudio se realizó la búsqueda de ciertos microorganismos a partir de agua de riego en diversas zonas agrícolas en

México, con características ambientales diferentes, así como diferentes procedencias del agua de riego.

Los microorganismos, por lo general se encuentran formando parte de comunidades, por lo que uno de los objetivos es aislarlos, lo cual puede realizarse mediante la técnica de estría en agar en cajas Petri para producir colonias independientes. Dentro de los medios de cultivo existen clasificaciones que permiten dicho fin, entre los que encontramos los medios selectivos y diferenciales, como agar MacConkey (MCK), agar eosina y azul de metileno (EMB), agar XLD entre otros (Aquiahuatl Ramos, et al. 2012),

De las 30 muestras que obtuvimos de agua proveniente de huertas del país, se les realizó la siembra y cultivo en caldos específicos para determinados microorganismos, y para el caso de *Salmonella* spp se requirió un segundo paso de enriquecimiento para posterior a esto sembrar en agares selectivos y diferenciales para cada microorganismo a buscar. Específicamente para *Enterococcus* spp como caldo de enriquecimiento utilizamos el caldo azida dextrosa ya que se ha reportado que es un caldo para el aislamiento de *Enterococcus* proveniente de agua, aguas residuales y leche (Hardy Diagnostics, 1990) Posterior al periodo de incubación fue sembrado en agar KF Streptococcus debido a que es un medio selectivo para el aislamiento de *Enterococcus* (Donnelly 1992). Para el caso de la búsqueda de *Salmonella* spp utilizamos como primer caldo el de enriquecimiento Universal, un enriquecimiento secundario en Rapaport-Vassiliadis tal como lo indica el Bacteriological Analytical Manual (BAM por sus siglas en inglés) y finalmente estriado sobre placas de agar XLD donde las colonias presuntivas eran colonias rosas con o sin centro negro, rosa salmón o amarillas con o sin centro negro. Para bacterias como *E. coli* y sus patotipos se realizó el primer enriquecimiento en caldo fosfato de triptona y se seleccionaron diferentes agares selectivos y diferenciales para el plaqueo siendo estos el EMB y MCK tomando en cuenta que *E. coli* en general se desarrolla adecuadamente en estos medios, y buscando el patotipo EHEC seleccionamos el agar SMAC en el cual podemos determinar la incapacidad de fermentar el sorbitol por parte de este patotipo reconociendo la colonia incolora, las colonias rosas obtenidas en este medio se consideraron presuntivas de *E. coli* (BD,2003 )

Después del crecimiento en cada agar respectivo, al realizar la búsqueda de *Salmonella* spp, *Enterococcus* spp y *E. coli* del grupo patogénico, de cada agar se seleccionaron hasta cinco colonias presuntivas para cada microorganismo en particular. Con respecto a los aislados presuntivos por estado, encontramos que a partir de las muestras procedentes de Chihuahua se aislaron menor porcentaje del total de bacterias presuntivas (23.19%) dentro de las cuales las menormente aisladas fueron para *Enterococcus* spp (4.34%). No fue el caso para los estados de Puebla y Veracruz, donde se presentó un mayor aislamiento del total de bacterias presuntivas siendo de 40.3 y 36.5% respectivamente.

En el caso de Chihuahua, estudios previos por Delgado-Gardea et al. 2016 con respecto a la búsqueda de microorganismos en agua, a 49 muestras de agua superficial de diversos sitios de la cascada de Basaseachic y sus ríos principales en diferentes estaciones del año, se les realizó recuento de coliformes totales y fecales y posteriormente se logró el aislamiento 33 colonias. Dentro de las colonias aisladas se identificaron como *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* y *Enterobacter cloacae*. Los autores sugieren que la presencia de estos microorganismos cerca de los asentamientos rurales indica que las aguas residuales son la fuente de contaminación.

En el estado de Veracruz las 10 muestras fueron provenientes de agua de río, en donde 8 de estas presentaron al menos un crecimiento de microorganismos presuntivos con un total de 181 (36.49%), donde los aislados presuntivos fueron menores para *Salmonella* con 9 (26%), seguido de *Enterococcus* spp con 37 (45.1%), EHEC con 45 (32.1%) y finalmente con mayor crecimiento presuntivo fue en los patotipos de EPEC, ETEC, EAEC con 90 (37.5%). En este estado, Megchún-García et al. 2015 realizaron la búsqueda de coliformes fecales y *E. coli* en agua superficiales, subterráneas y de riego cerca de las zonas cañeras encontrando una alta concentración de coliformes fecales principalmente en aguas superficiales (52,419.2 MNP/100 ml), así como en subterráneas (198.6 MNP/100ml) y de riego (72,501.1 MNP/ 100 ml). En tanto *E. coli* se encontró en agua subterránea en un 27% y en aguas superficiales en un 92% y para el caso de las aguas superficiales se encontró en un 100%, en comparación de las otras fuentes,

observándose que las principales fuentes de contaminación fueron los desagües y las fosas sépticas.

Puebla fue el estado con un mayor número de aislados presuntivos (40.32%), siendo de *E. coli* en su mayoría, debido quizá a que como se ha reportado previamente que las características del agua en Puebla incluyendo su pH de 7.7 el cual al ser neutro ayuda al desarrollo de la mayoría de las bacterias (Can-Chulim et al. 2014) como *E. coli*, la cual se desarrolla mejor en un pH 7.2 a 7.8 (Gonzales-Siles y Sjöling, 2016).

Dentro de los microorganismos asociados a aguas de riego podemos mencionar a *E. coli* y *Enterococcus* spp, tal como Henry et al. 2016, quienes realizaron un estudio en un río de Melbourne, Australia donde se encontró la presencia de *E. coli* y *Enterococcus* en todas las muestras analizadas. En Sudáfrica Jongman y Korsten 2016 evaluaron la calidad de agua de riego en diferentes zonas de producción agrícola, donde los coliformes totales y *E. coli* se encontraron presentes en hasta 1 a 5.27 log MPN/100ml principalmente en agua de río.

El uso de las aguas no tratadas en el riego de vegetales es un problema debido a su escasez, tal como se reporta recientemente donde en Ghana, Africa, Quensah et al. 2020 identificaron el uso de aguas no tratadas en aproximadamente el 70% de los productores agrícolas. Esto a nivel mundial representa un alto riesgo, debido a que la escasez de agua y el uso en la agricultura representa un riesgo debido al contenido de bacterias patógenas las cuales pueden llegar a contaminar los productos vegetales (Iwu y Okoh, 2019).

La capacidad de las bacterias patógenas de producir una infección en el huésped depende de la capacidad de contrarrestar el ataque de defensa por el huésped. Los factores de virulencia son el medio adecuado para la producción de las infecciones ya que el término de virulencia se refiere a la capacidad de un organismo para infectar al huésped y así causar una enfermedad (Sharma et al. 2017)

Los aislados obtenidos (496) se les confirmó mediante la búsqueda de genes relativos a sus factores de virulencia principales tales como *invA* para *Salmonella*, *efaA*, *ccf*, *eda*, para *Enterococcus* spp así como *gelE* para *Enterococcus faecalis* y *stx1*, *sxt2*, *eae*, *li*, *bf* y *aafll* para patotipos de *E. coli*. Los métodos basados en cultivos son clave para

comprender las características fenotípicas de los aislados, sin embargo tienen límites ambientales, debido a que solo la fracción cultivable representa el 1% del total (Pazda et al., 2019), así como las similitudes fenotípicas en el desarrollo de los agares. Métodos moleculares basados en el aislamiento de ADN total o ADN bacteriano son muy eficaces, debido a la detección de las secuencias de nucleótidos específicas que codifican ya sea para los genes de virulencia o genes de resistencia a antibióticos, mediante PCR (Pazda et al. 2019).

A partir de los aislados presuntivos se identificaron cinco EPEC, de las cuales tres fueron procedentes de Veracruz y dos de Puebla. Se ha reportado la clasificación de EPEC en típica (tEPEC) y atípica (aEPEC) basados en la presencia de genes específicos, para el caso de las tEPEC deben ser positivos los genes *eae* (intimina) y *bfp* ("pili formadores de haces" codificados por el plásmido EAF) y la aEPEC es la ausencia del plásmido EAF, por lo que su patrón es *eae*<sup>+</sup> y *bfp*<sup>-</sup> (Haymaker et al., 2019).

Recientemente, Haymaker et al. 2019 analizaron la prevalencia de *E. coli* enteropatógena atípica y Shiga-toxigénica en aguas superficiales no tratadas y agua recuperada en el atlántico medio de Estados Unidos, encontrando una mayor incidencia de aEPEC en los aislados (9.0%). En nuestro caso, aEPEC fue encontrada en 3 de los 5 aislados identificados como patotipos de *E. coli*, lo cual es relevante ya que se ha reportado que aEPEC está muy relacionado a los casos diarreicos (Haymaker et al. 2019). Al mismo tiempo, de los aislados encontramos dos positivos para tEPEC provenientes de Veracruz. Las cepas típicas de EPEC se han reconocido como agentes importantes de diarrea en los países en desarrollo, mientras que las cepas atípicas se han aislado comúnmente en los países desarrollados (Adefisoye y Okoh, 2016).

Así mismo, al realizar la confirmación de ETEC, ésta solo se encontró en una sola muestra proveniente de Puebla. Dado que *E. coli* es una bacteria que tiene la capacidad de sobrevivir a diferentes ambientes, ya sea en el tracto intestinal, como en el ambiente, Gonzales-Siles y Sjöling, 2016 analizaron los diferentes ambientes en los cuales se desarrolla ETEC, siendo los vegetales y los ambientes acuáticos un importante reservorio de este patotipo, ya que se ha reportado que ETEC tiene la capacidad de adaptarse de una mejor manera a los ambientes en un pH de 7.2 a 7.8, además, otro

factor de importancia es la temperatura de crecimiento de ETEC, Qadri et al., 2005 analizaron la capacidad que tiene ETEC de adaptarse a las diversas estaciones del año, donde se encontró que es más común que ETEC esté presente en los meses de abril a mayo, lo cual coincide con nuestro estudio, ya que la toma de muestra fue en el mes de abril.

Para el caso de la confirmación de *Enterococcus* spp se logró a partir de una muestra proveniente de Veracruz, a dicho aislado se le realizó la identificación como *E. faecalis* (cepa mayormente relacionada a enfermedades en humanos) buscando la presencia del gen *gelE* específico de especie ya que codifica para la producción de la gelatinasa (Comerlato, et al. 2013). Al realizar la confirmación de *E. faecalis* esta fue negativa por lo cual el microorganismo es considerado *Enterococcus* spp, debido a que solo encontramos la presencia de los genes *efaA*, *ccf* y *eda*, los cuales son asociados a factores de virulencia en el género de *Enterococcus* spp.

El uso inadecuado de antibióticos en medicina humana, veterinaria y agrícola ha tenido como resultado la liberación constante de estos antibióticos al medio ambiente. Junto con estos antibióticos, bacterias con resistencia a ellos se pudieran liberar en las aguas que pudieran irrigar diversos cultivos (Pazda et al. 2019).

En este sentido, estudios previos realizados por Odonkor y Addo, 2018, buscaron la prevalencia de resistencia a antibióticos en cepas de *E. coli* provenientes de fuentes de agua, en las cuales, encontraron que de 97 aislados 32.99% presentaba resistencia a penicilina, así como cefuroxima (28.87%), eritromicina (23.71%), tetraciclina (21.45%), ampicilina (11.32%) y ciprofloxacina (8.25%). En el caso de nuestros 5 aislados confirmados como *E. coli* patotipo (EPEC y ETEC) se identificó una alta resistencia a vancomicina (75%), así como a ampicilina (62.5%) y eritromicina (62.5%). Mientras que la mayor sensibilidad de EPEC y ETEC fue frente a ciprofloxacina, trimetoprima y sulfametoxazol/ trimetoprima con una sensibilidad del 100% en los tres antibióticos.

Estudios previos con respecto a la incidencia de patógenos con resistencia a antibióticos provenientes de agua de riego incluyen la búsqueda de resistencia a antibióticos en diferentes especies de *Enterococcus* por Abriouel et al, 2008 donde analizaron estas

diferentes cepas provenientes de frutas, vegetales, agua, suelo y aislados clínicos, en donde las muestras de agua se presentaron resistentes a antibióticos como quinupristina/dalfopristina, estreptomina, nitrofurantoína, levofloxacina, ciprofloxacina, rifampicina, cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina y penicilina. En nuestro estudio se identificó la presencia de resistencia en los dos aislados de *Enterococcus* para polimixina B, Colistina y cefotaxima.

El grupo de antibióticos de las polimixinas que incluyen a la polimixina B y la colistina, son algunos de los antibióticos que se utilizan para el tratamiento de bacterias Gram negativas, debido a que su mecanismo de acción va dirigido a la unión a la membrana celular externa en estas bacterias, lo cual permite el cambio de la permeabilidad de la membrana y así la muerte celular (Cassir et al. 2014) esto coincide con nuestro estudio debido a que en este grupo de antibióticos no se encontró resistencia en el grupo de las *E. coli*, sin embargo los aislados Gram positivos de *Enterococcus* spp sí presentaron resistencia a Polimixina B y colistina. Así como vancomicina, la cual se presentó resistencia en todas las *E. coli*, debido a que este es un antibiótico glucopéptido utilizado principalmente en Gram positivas, la cual inhibe la polimerización de peptidoglucanos en la pared celular, debilitando las paredes celulares, causando así la fuga de componentes intracelulares, dando como resultado la muerte celular bacteriana (Patel et al. 2019; Gardete y Tomasz, 2014) por lo cual en nuestra búsqueda de resistencia estuvo presente en las Gram negativas y sensible a las Gram positivas.

En cuanto a la resistencia genética a antibióticos a los ocho patógenos encontrados, se les realizó la búsqueda de 19 genes resistencia a antibióticos los cuales incluyeron a los grupos de  $\beta$ -lactámicos (*blaCARB-4*, *blaOXA-5*, *BlaSHV*, *Ctxm-1*, *AmpC*), Tetraciclinas (*tetA*, *tetB*), Macrólidos (*ermA*, *ermB*, *ermF*), Sulfonamidas (*SulI*), Fluoroquinolonas (*qnrA*), Polimixinas (*Mcr-1*), Glicopéptidos (*vanB*), Integrinas (*IntI*, *IntII*, *IntIII*) y Plásmidos (*oriV*, *orit*), encontrando únicamente la presencia de gen *tetA* en el aislado de ETEC proveniente de Puebla.

Un estudio realizado en aguas residuales de Sudáfrica realizaron la búsqueda *E. coli* y sus patotipos mediante la identificación por sus genes de virulencia, además, de búsqueda de genes de resistencia a antibióticos, encontrando que el 32.7% de los



aislados (EPEC, ETEC, EAEC, UPEC y *E. coli* asociada a meningitis) presentaban resistencia a antibióticos como amikacina, ampicilina, cefotaxima, cloranfenicol, ciprofloxacina, sulfato de colistina, gentamicina, imipenem, meropenem, ácido nalidíxico, nitrofurantoina, norfloxacina, polimixina B, estreptomina y tetraciclina (Adefisoye y Okoh, 2016). De la misma manera, en nuestro país, en un estudio realizado en aguas superficiales usadas en zonas agrícolas de México, en diferentes aislados de *E. coli*, indicadores fecales e indicadores totales se encontró que el 53% de los aislados fueron resistentes a al menos un antibiótico y el 15% a múltiples fármacos (Delgado-Gardea et al., 2016)

El gen reportado como positivo fue el *tetA*, el cual es uno de los que codifican para resistencia a tetraciclinas. Las tetraciclinas son un grupo de antibióticos naturales que actúan inhibiendo la síntesis de las proteínas bacterias, al prevenir la asociación de aminoacil-tARN con el ribosoma bacteriano, donde su sitio de unión de alta afinidad para este antibiótico es la subunidad ribosómica 30S (Chopra y Roberts, 2001). Se ha reportado que después de su consumo humano durante un tratamiento contra la infección, aproximadamente el 70% de estos antibióticos es excretado y liberado en forma activa al medio ambiente, a través de la orina o las heces. Cuentan con un carácter altamente hidrofílico y baja volatilidad, lo cual los hace muy estables en el medio acuático (Pazda et al. 2019). La resistencia frente a este antibiótico se ha reportado, el caso de Begum et al. 2016 buscaron aislados clínicos de pacientes con diarrea en donde primeramente se identificó la presencia de ETEC en un 12%, a estos aislados buscaron la resistencia a diferentes antibióticos, donde tetraciclina se encontró en un 42%, siendo esto un alto porcentaje en cuanto a la presencia de dicho antibiótico.

En general se han reportado niveles de presencia de estas bacterias en aguas de riego en diferentes partes del mundo. Dicha presencia de las bacterias se ve influenciada por diversos factores, tales como la temperatura en el ambiente, el flujo, la humedad y la lluvia (Henry et al., 2016) lo cual varía de acuerdo a sus diferentes condiciones geográficas y estaciones del año (Alegbeleye et al. 2018). Las muestras de agua no tratadas son matrices muy complejas, las cuales contienen altos niveles de materia orgánica e inorgánica las cuales dificultan el análisis microbiológico a nivel molecular,

así como, inhibidores como sustancias húmicas o detergentes que dificultan la detección de bacterias específicas y sus genes funcionales (Volkmann et al., 2007). Esta pudiera ser alguna de las razones de la baja prevalencia de bacterias encontradas, sin embargo es de gran importancia ya que se logró identificar su especificidad en el ambiente acuático.

Con todo lo anterior, pudimos identificar *Enterococcus spp* a partir de muestras de agua con las que se riegan cultivos en nuestro país y además, patotipos de *E. coli* como las EPEC y ETEC las cuales son de suma importancia dado que al estar en el ambiente pudieran ser un riesgo para el humano y la salud una vez que estas lleguen al consumidor.

Inclusive la identificación del gen de resistencia a antibiótico como tetraciclina en una *E. coli* libre en el ambiente hace posible que ésta pueda transferir dicho gen a bacterias presentes en las aguas de riego, pudiendo ser patógenas o no, favoreciendo con ello la diseminación de la resistencia a antibióticos.

## 9. CONCLUSIONES

De 30 muestras analizadas (10 de cada Estado) se logró el aislamiento de 496 cepas presuntiva de patógenos como *Salmonella* spp, *Enterococcus* spp y patotipos de *E. coli*.

En el caso de *Salmonella* spp ningún aislado fue confirmado por la técnica de PCR.

A partir de muestras provenientes de agua de riego de Veracruz, se logró la confirmación de dos cepas de *Enterococcus* spp y 3 de EPEC (dos de ellas típicas y una atípica) todas de la muestra número 3 proveniente de Rio.

Para el caso de Puebla se logró el aislamiento e identificación de tres cepas de *E. coli*, aEPEC tanto de la muestra numero 1 como de la 4 y una ETEC a partir de la muestra numero 7 todas provenientes de lago.

De las muestras provenientes del estado de Chihuahua no se logró en este caso el aislamiento ni identificación de los patógenos aquí buscados.

De los dos aislados de *Enterococcus* spp, estos mostraron resistencia a polimixina B, colistina y cefotaxima y susceptibilidad a ampicilina, tetraciclina, vancomicina, eritromicina, ciprofloxacina, trimetoprima.

Para el caso de los aislados de patotipos de *E. coli*, se encontró que estos fueron resistentes a vancomicina y sensibles a polimixina B, colistina, ciprofloxacina y trimetoprima.

Todos los aislados fueron sensibles a ciprofloxacina y trimetoprima, y todos los aislados fueron resistentes a al menos 3 antibióticos.

En ETEC aislada de Puebla se encontró el gen de resistencia a tetraciclina *tetA*.

## **10. PERSPECTIVAS**

Evaluar la presencia de los genes de virulencia bacteriana y resistencia a antibióticos directamente de las muestras de agua (resistoma y viruloma).

Evaluar todos los genes de resistencia a antibióticos reportado para cada grupo de antibióticos.

Evaluar otras metodología para la detección de microorganismos a partir de este tipo de muestras, tales como filtración por membrana o bien técnicas moleculares enfocadas en el estado viable no cultivable de las bacteria.

Evaluar la presencia de residuos de antibióticos en las muestras de agua de riego.

Realizar la búsqueda de otros microorganismos como los indicadores de contaminación fecal para conocer la distribución de estos en este tipo de ambientes.

Evaluar la posibilidad de virus como responsables de transferencia de material genético.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, L., Mendoza, C., & Oyón, R. (2001). Coliformes totales, fecales y algunas enterobacterias, *Sthaphylococcus* sp. y hongos en ensaladas para perro calientes expendidas en la ciudad de Maracay, Venezuela. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 51(4), 366-370
- Adefisoye, M. A., & Okoh, A. I. (2016). Identification and antimicrobial resistance prevalence of pathogenic *Escherichia coli* strains from treated wastewater effluents in Eastern Cape, South Africa. *MicrobiologyOpen*, 5(1), 143-151.
- Adesiji, Y. O., Deekshit, V. K., & Karunasagar, I. (2014). Antimicrobial-resistant genes associated with *Salmonella* spp. isolated from human, poultry, and seafood sources. *Food Science & Nutrition*, 2(4), 436-442.
- Alegbeleye, Oluwadara Oluwaseun, Ian Singleton, y Anderson S. Sant'Ana. 2018. «Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review». *Food Microbiology* 73 (agosto): 177-208.
- Alipour, M., Hajiesmaili, R., Talebjannat, M., & Yahyapour, Y. (2014). Identification and Antimicrobial Resistance of *Enterococcus* Spp. Isolated from the River and Coastal Waters in Northern Iran. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Alós, Juan-Ignacio. 2015. «Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global». *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 692-99.
- Antwi-Agyei, Prince, Sandy Cairncross, Anne Peasey, Vivien Price, Jane Bruce, Kelly Baker, Christine Moe, Joseph Ampofo, George Armah, y Jeroen Ensink. 2015. «A Farm to Fork Risk Assessment for the Use of Wastewater in Agriculture in Accra, Ghana». *PLOS ONE* 10 (11): e0142346.
- Arabestani, Mohammad Reza, Mona Nasaj, y Seyed Masoud Mousavi. 2017. «Correlation between Infective Factors and Antibiotic Resistance in *Enterococci* Clinical Isolates in West of Iran». *Chonnam Medical Journal* 53 (1): 56-63.

- Ávila, Diana N. Mojica, Román Y. Ramírez-Rueda, y Mery I. Espitia Mayorga. 2015. «Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos vegetales contra *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina». *Salud & Sociedad* 2 (1).
- Baquero, F., Martínez, J.-L., & Cantón, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), 260-265.
- Baumgartner, A., Niederhauser, I., Diston, D., & Moor, D. (2016). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) in water from karst springs: detection with real-time PCR and isolation of strains. *Journal Für Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit*, 11(4), 353-357.
- Barbier, François, y Michel Wolff. 2010. «Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa* - Vers l'impasse thérapeutique ?» *médecine/sciences* 26 (11): 960-68.
- Barlow, Miriam. 2009. «What Antimicrobial Resistance Has Taught Us About Horizontal Gene Transfer». En *Horizontal Gene Transfer*, 397-411. Methods in Molecular Biology. Humana Press.
- Barrantes, Kenia, y Rosario Achí. 2011. «Calidad microbiológica y análisis de patógenos (*Shigella* y *Salmonella*) en lechuga». *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 31 (1): 31-36.
- Bartz, Faith E., Jacquelyn Sunshine Lickness, Norma Heredia, Anna Fabiszewski de Aceituno, Kira L. Newman, Domonique Watson Hodge, Lee-Ann Jaykus, Santos García, y Juan S. Leon. 2017. «Contamination of Fresh Produce by Microbial Indicators on Farms and in Packing Facilities: Elucidation of Environmental Routes». *Applied and Environmental Microbiology* 83 (11).
- Begum, Y. A., Talukder, K. A., Azmi, I. J., Shahnaj, M., Sheikh, A., Sharmin, S., ... Qadri, F. (2016). Resistance Pattern and Molecular Characterization of Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) Strains Isolated in Bangladesh. *PLoS ONE*, 11(7).
- Ben Said, Leila, Naouel Klibi, Raoudha Dziri, Francesca Borgo, Abdellatif Boudabous, Karim Ben Slama, y Carmen Torres. 2016. «Prevalence, Antimicrobial Resistance and Genetic Lineages of *Enterococcus* Spp. from Vegetable Food, Soil and Irrigation Water

in Farm Environments in Tunisia». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96 (5): 1627-33.

Bennett, P. M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*, 153(Suppl 1), S347-S357.

Berger, Cedric N., Samir V. Sodha, Robert K. Shaw, Patricia M. Griffin, David Pink, Paul Hand, y Gad Frankel. 2010. «Fresh Fruit and Vegetables as Vehicles for the Transmission of Human Pathogens». *Environmental Microbiology* 12 (9): 2385-97.

Berthe, T., Ratajczak, M., Clermont, O., Denamur, E., & Petit, F. (2013). Evidence for Coexistence of Distinct *Escherichia coli* Populations in Various Aquatic Environments and Their Survival in Estuary Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(15), 4684-4693.

Beuchat, Larry R. 2002. «Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables». *Microbes and Infection* 4 (4): 413-23.

Boehm, A. B., & Sassoubre, L. M. (2014). Enterococci as Indicators of Environmental Fecal Contamination. En M. S. Gilmore, D. B. Clewell, Y. Ike, & N. Shankar (Eds.), *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*.

Blount, Zachary D. 2015. «The unexhausted potential of *E. coli*». *eLife* 4.

Böckelmann, U., Dörries, H.H., Ayuso-Gabella, N., de Marçay, S. M., Tandoi, V., Levantesi, C., Masciopinto, C., Van Houtte, E., Szewzyk, U., Wintgens, T., and Grohmann, E. 2009. Quantitative PCR monitoring of antibiotic resistance genes and bacterial pathogens in three European artificial groundwater recharge system. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(1):154-163.

Böhnlein, C., Kabisch, J., Meske, D., Franz, C. M. A. P., & Pichner, R. (2016). Fitness of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)/Enteroaggregative *E. coli* O104:H4 in Comparison to That of EHEC O157: Survival Studies in Food and In Vitro. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(21), 6326-6334.

Borbolla-Sala, Manuel E., Ma del Rosario Vidal-Pérez, Olga E. Piña-Gutiérrez, Isabel Ramírez-Messner, y Juan J. Vidal-Vidal. 2004. «Contaminación de los alimentos por *Vibrio cholerae*, coliformes fecales, *Salmonella*, hongos, levaduras y *Staphylococcus aureus* en Tabasco durante 2003». *Salud en Tabasco* 10 (2): 221-32.

Borriello, G., Lucibelli, M. G., De Carlo, E., Auriemma, C., Cozza, D., Ascione, G., ... Galiero, G. (2012). Characterization of enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) and necrotoxigenic *E. coli* (NTEC) isolated from diarrhoeic Mediterranean water buffalo calves (*Bubalus bubalis*). *Research in Veterinary Science*, 93(1), 18-22.

Bouzari, S., Farhang, E., Hosseini, S. M., & Alikhani, M. Y. (2018). Prevalence and antimicrobial resistance of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with acute diarrhea. *Iranian Journal of Microbiology*, 10(3), 151-157.

Burmeister, Alita R. 2015. «Horizontal Gene Transfer». *Evolution, Medicine, and Public Health* 2015 (1): 193-94.

Byappanahalli, M. N., Nevers, M. B., Korajkic, A., Staley, Z. R., & Harwood, V. J. (2012). Enterococci in the Environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(4), 685-706.

Cabrera, Cristina Eugenia, Rommel Fabián Gómez, y Andrés Edmundo Zúñiga. 2007. «La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación». *Colombia Médica* 38 (2).

Can-Chulim, Á., Ortega-Escobar, H. M., Sánchez-Bernal, E. I., & Cruz-Crespo, E. (2014). Calidad del agua para riego en la Sierra Norte de Puebla, México. *Tecnología y ciencias del agua*, 5(5), 77-96.



Cárdenas, Carmen, Karina Molina, Norma Heredia, y Santos García. 2013. «Evaluation of Microbial Contamination of Tomatoes and Peppers at Retail Markets in Monterrey, Mexico». *Journal of Food Protection* 76 (8): 1475-79.

Castellón-Martínez, Édgar, J. Luis Chávez-Servia, José C. Carrillo-Rodríguez, y Araceli M. Vera-Guzman. 2012. «Preferencias de consumo de chiles (*Capsicum annum* L.) nativos en los valles centrales de Oaxaca, México». *Revista fitotecnia mexicana* 35 (SPE5): 27-35.

Cassir, N., Rolain, J.-M., & Brouqui, P. (2014). A new strategy to fight antimicrobial resistance: the revival of old antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, 5.

Castro-Rosas J., Gómez-Aldapa C, Acevedo-Sandoval O. A., González-Ramírez C. A., Villagómez-Ibarra J. R., Chavarría-Hernández N., Villarruel-López A., Torres-Vitela M. R. 2011. Frequency and behavior of Salmonella and Escherichia coli on whole and sliced jalapeño and serrano Peppers. *Journal of Food Protection*. 74,6:874-881.

Chen, Lihong, Jian Yang, Jun Yu, Zhijian Yao, Lilian Sun, Yan Shen, y Qi Jin. 2005. «VFDB: a reference database for bacterial virulence factors». *Nucleic Acids Research* 33 (Database Issue): D325-28.

Chiruchi, J., Zoboli Gabito, J., Usher, S., & Serrentino, C. (1996). *MANUAL DE PROCEDIMIENTOS ANALITICOS PARA AGUAS Y EFLUENTES*. Laboratorio de DINAMA Clegg, Steven, y Caitlin N. Murphy. 2016. «Epidemiology and Virulence of Klebsiella Pneumoniae». *Microbiology Spectrum* 4 (1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0005-2012>.

Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(2), 232-260

Comerlato, C. B., de Resende, M. C. C., Caierão, J., & d'Azevedo, P. A. (2013). Presence of virulence factors in Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium susceptible and resistant to vancomycin. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(5), 590-595.

Conte, P. M., Longhi, C., Marazzato, M., Conte, L. A., Aleandri, M., Lepanto, S. M., Zagaglia, C., Nicoletti, M., Alo, M., Totino, V., Palamara, T. A., and Schippa, S. 2014. Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) in pediatric Crohn's disease patients: phenotypic and genetic pathogenic features. *Biomed Central*. 7:74-78.

Critzer, F. J., & Doyle, M. P. (2010). Microbial ecology of foodborne pathogens associated with produce. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(2), 125-130.

Davin-Regli, Anne, y Jean-Marie Pagès. 2015. «Enterobacter aerogenes and Enterobacter cloacae; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment». *Frontiers in Microbiology* 6 (mayo).

Delgado-Gardea, M. C. E., Tamez-Guerra, P., Gomez-Flores, R., Zavala-Díaz de la Serna, F. J., Eroza-de la Vega, G., Nevárez-Moorillón, G. V., ... Infante-Ramírez, R. (2016). Multidrug-Resistant Bacteria Isolated from Surface Water in Bassaseachic Falls National Park, Mexico. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(6).

Donnelly, C. W., R. E. Bracket, D. Doores, W. H. Lee, and J. Lovett. 1992. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 3rd ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

Drevets, Douglas A., y Michael S. Bronze. 2008. «Listeria Monocytogenes: Epidemiology, Human Disease, and Mechanisms of Brain Invasion». *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 53 (2): 151-65.

Dupré, I., Zanetti, S., Schito, M. A., Fadda, G., and Sechi, A. L. 2003. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *Journal of Medical Microbiology*. 52:491-498.

«El Riego de los Suelos con Aguas Residuales: Un Serio Problema para la Salud Humana (Enfermedades Infecciosas) | Un Universo invisible bajo nuestros pies». s. f. Accedido 3 de agosto de 2018.

Emery, J. L. 1969. «ELECTROLYTE METABOLISM IN SEVERE INFANTILE MALNUTRITION». *Journal of Clinical Pathology* 22 (3): 381.

Enayati, M., Sadeghi, J., Nahael, R. M., Aghazadeh, M., Pourshafie, R. M., and Talebi, M. 2015. Virulence and antimicrobial resistance of *Enterococcus faecium* isolated from water samples. *Letters in Applied Microbiology*. 61:339-345.

Falomir, María Pilar, Hortensia Rico, y Daniel Gozalbo. 2013. «Enterobacter and Klebsiella Species Isolated from Fresh Vegetables Marketed in Valencia (Spain) and Their Clinically Relevant Resistances to Chemotherapeutic Agents». *Foodborne Pathogens and Disease* 10 (12): 1002-7.

Faruque, Shah M., M. John Albert, y John J. Mekalanos. 1998. «Epidemiology, Genetics, and Ecology of Toxigenic *Vibrio cholerae*». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 (4): 1301-14.

Fernández, Fernández, F. J, J. de la Fuente Aguado, M. Rubianes González, S. Pérez Fernández, M. Álvarez Fernández, A. Nodar Germiñas, B. Sopeña Pérez-Argüelles, y C. Martínez Vázquez. 2004. «Bacteriemia por *Enterococcus faecalis*». *Revista Clínica Española* 204 (5): 244-50.

Ferreira, A. R. M., Silva, S. T., Stella, E. A., Conceição, R. F., dos Reis, F. E., and Moreira,

N. C. 2015. Detection of virulence factors and antimicrobial resistance patterns in shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from sheep. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 35(9):775-780.

Fleckenstein, J. M. (2013). Chapter 6 - Enterotoxigenic *Escherichia coli*. En M. S. Sonnenberg (Ed.), *Escherichia coli (Second Edition)* (pp. 183-213).

Francisco Linares-Rodríguez, J., & Luis Martínez-Menéndez, J. (2005). Resistencia a los antimicrobianos y virulencia bacteriana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23(2), 86-93.

- Forbes, Betty A. 2009. *Diagnostico Microbiologico*. Ed. Médica Panamericana.
- Garai, Preeti, Divya Prakash Gnanadhas, y Dipshikha Chakravorty. 2012. «Salmonella enterica serovars Typhimurium and Typhi as model organisms». *Virulence* 3 (4): 377-88.
- Gardete, S., & Tomasz, A. (2014). Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(7), 2836-2840.
- Giannella, Ralph A. 1996. «Salmonella». En *Medical Microbiology*, editado por Samuel Baron, 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Goldwater, P. N., & Bettelheim, K. A. (2012). Treatment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infection and hemolytic uremic syndrome (HUS). *BMC Medicine*, 10, 12.
- Gonzales-Siles, L., & Sjöling, Å. (2016). The different ecological niches of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Environmental Microbiology*, 18(3), 741-751.
- Gooderham, W. James, y Robert E. W. Hancock. 2009. «Regulation of Virulence and Antibiotic Resistance by Two-Component Regulatory Systems in *Pseudomonas Aeruginosa*». *FEMS Microbiology Reviews* 33 (2): 279-94.
- Guevara, Yolanda, y Anna Maselli. 2005. «Bacteriosis en Cilantro (*Coriandrum sativum* L.) causada por *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson en Venezuela». *Revista Mexicana de Fitopatología* 23 (1).
- Guiral, E., Quiles, M. G., Muñoz, L., Moreno-Morales, J., Alejo-Cancho, I., Salvador, P., ... Vila, J. (2019). Emergence of Resistance to Quinolones and  $\beta$ -Lactam Antibiotics in Enteroaggregative and Enterotoxigenic *Escherichia coli* Causing Traveler's Diarrhea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(2).
- Gunn, John S., Joanna M. Marshall, Stephen Baker, Sabina Dongol, Richelle C. Charles, y Edward T. Ryan. 2014. «Salmonella chronic carriage: epidemiology, diagnosis and gallbladder persistence». *Trends in microbiology* 22 (11): 648-55.

Guo, Xuan, Marc W. van Iersel, Jinru Chen, Robert E. Brackett, y Larry R. Beuchat. 2002. «Evidence of Association of Salmonellae with Tomato Plants Grown Hydroponically in Inoculated Nutrient Solution». *Applied and Environmental Microbiology* 68 (7): 3639-43.

Harris, L. J., J. N. Farber, L. R. Beuchat, M. E. Parish, T. V. Suslow, E. H. Garrett, y F. F. Busta. 2003. «Outbreaks Associated with Fresh Produce: Incidence, Growth, and Survival of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2 (s1): 78-141.

Hardy Diagnostics 1990 . *Azide Dextrose Broth for Enterococcus faecalis*. . Recuperado 27 de febrero de 2020, de [https://catalog.hardydiagnostics.com/cp\\_prod/Content/hugo/AzideDextBroth.htm](https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/AzideDextBroth.htm)

Haymaker, J., Sharma, M., Parveen, S., Hashem, F., May, E. B., Handy, E. T., ... Sapkota, A. R. (2019). Prevalence of Shiga-toxigenic and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in untreated surface water and reclaimed water in the Mid-Atlantic U.S. *Environmental Research*, 172, 630-636.

He, Y., Guo, X., Xiang, S., Li, J., Li, X., Xiang, H., ... Chen, J. (2016). Comparative analyses of phenotypic methods and 16S rRNA, *khe*, *rpoB* genes sequencing for identification of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 109(7), 1029-1040.

Hebbelstrup Jensen, Betina, Katharina E. P. Olsen, Carsten Struve, Karen Angeliki Krogfelt, y Andreas Munk Petersen. 2014. «Epidemiology and Clinical Manifestations of Enteroaggregative *Escherichia coli*». *Clinical Microbiology Reviews* 27 (3): 614-30.

Heredia, Norma, Cindy Caballero, Carmen Cárdenas, Karina Molina, Rafael García, Luisa Solís, Vanessa Burrowes, et al. 2016. «Microbial Indicator Profiling of Fresh Produce and Environmental Samples from Farms and Packing Facilities in Northern Mexico». *Journal of Food Protection* 79 (7): 1197-1209.

Hernández, Baltasar Balsalobre, y Joaquín Hernández-Godoy. 2004. «Resistencias a antibióticos en *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* aislados de alimentos de origen animal». *Revista de Salud Ambiental* 4 (1-2): 42-46.

Herrera, Marco L., Alvaro Vargas, Tatiana Moya, José F. Herrera, José P. Marín, Reymond Rodríguez, y Marlen Herrera. 2001. «Cepas de *Listeria monocytogenes* con resistencia antimicrobiana». *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera* 36 (1-2): 31-35.

Henry, R., Schang, C., Kolotelo, P., Coleman, R., Rooney, G., Schmidt, J., Deletic, A., & McCarthy, D. T. (2016). Effect of environmental parameters on pathogen and faecal indicator organism concentrations within an urban estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 174, 18-26.

Hirovani, H., J. Naranjo, P. G. Moroyoqui, y C. P. Gerba. 2002. «Demonstration of Indicator Microorganisms on Surface of Vegetables on the Market in the United States and Mexico». *Journal of Food Science* 67 (5): 1847-50.

Hu, Y., Gao, G. F., & Zhu, B. (2017). The antibiotic resistome: gene flow in environments, animals and human beings. *Frontiers of Medicine*, 11(2), 161-168.

Ibarra-Sánchez, L. S., S. Alvarado-Casillas, M. O. Rodríguez-García, N. E. Martínez-González, y A. Castillo. 2004. «Internalization of Bacterial Pathogens in Tomatoes and Their Control by Selected Chemicals». *Journal of Food Protection* 67 (7): 1353-58.

Iranzad, M., and Hakemi-Vala, M. 2017. The role of *parC*, *parE*, and *qnrB* genes in ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections. *Archives of Pediatric Infectious Diseases*. 5(3):7.

Iwu, C. D., & Okoh, A. I. (2019). Preharvest Transmission Routes of Fresh Produce Associated Bacterial Pathogens with Outbreak Potentials: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(22).

Jarvis, Karen G., James R. White, Christopher J. Grim, Laura Ewing, Andrea R. Ottesen, Junia Jean-Gilles Beaubrun, James B. Pettengill, Eric Brown, y Darcy E. Hanes. 2015.

«Cilantro microbiome before and after nonselective pre-enrichment for Salmonella using 16S rRNA and metagenomic sequencing». *BMC Microbiology* 15 (agosto).

Jongman, M., & Korsten, L. (2017). Assessment of irrigation water quality and microbiological safety of leafy greens in different production systems. *Journal of Food Safety*, 37(3), e12324.

Kelly, B. G., A. Vespermann, y D. J. Bolton. 2009. «Horizontal Gene Transfer of Virulence Determinants in Selected Bacterial Foodborne Pathogens». *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 47 (5): 969-77.

Kirk, Martyn D., Sara M. Pires, Robert E. Black, Marisa Caipo, John A. Crump, Brecht Devleeschauwer, Dörte Döpfer, et al. 2015. «World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A Data Synthesis». *PLoS Medicine* 12 (12).

Klockgether, Jens, y Burkhard Tümmler. 2017. «Recent advances in understanding *Pseudomonas aeruginosa* as a pathogen». *F1000Research* 6 (julio).

Kung, Stephanie H., Adam C. Retchless, Jessica Y. Kwan, y Rodrigo P. P. Almeida. 2013. «Effects of DNA Size on Transformation and Recombination Efficiencies in *Xylella fastidiosa*». *Applied and Environmental Microbiology* 79 (5): 1712-17.

Lee, D.-W., Gwack, J., & Youn, S.-K. (2012). Enteropathogenic *Escherichia coli* Outbreak and its Incubation Period: Is it Short or Long? *Osong Public Health and Research Perspectives*, 3(1), 43-47.

Levantesi, C., Bonadonna, L., Briancesco, R., Grohmann, E., Toze, S., & Tandoi, V. (2012). Salmonella in surface and drinking water: Occurrence and water-mediated transmission. *Food Research International*, 45(2), 587-602.

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.

Lood, R., Ertürk, G., & Mattiasson, B. (2017). Revisiting Antibiotic Resistance Spreading in Wastewater Treatment Plants – Bacteriophages as a Much Neglected Potential Transmission Vehicle. *Frontiers in Microbiology*, 8.

Marchesi, J. R., Sato, T., Weightman, A. J., Martin, T. A., Fry, J. C., Hiom, S. J., Dymock, D., and Wade, W. D. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*. 64(2):795-799.

Marteyn, Benoit, Anastasia Gazi, y Philippe Sansonetti. 2012. «Shigella». *Gut Microbes* 3 (2): 104-20.

Martins da Costa, P., Vaz-Pires, P., & Bernardo, F. (2006). Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolated in inflow, effluent and sludge from municipal sewage water treatment plants. *Water Research*, 40(8), 1735-1740.

Megchún-García, J., Landeros-Sánchez, C., Soto-Estrada, A., Castañeda-Chávez, M. del R., Martínez-Dávila, J., Nikolskii-Gavrilov, I., ... Lango-Reynoso, F. (2015). Total Coliforms and *Escherichia coli* in Surface and Subsurface Water from a Sugarcane Agroecosystem in Veracruz, Mexico. *Journal of Agricultural Science*, 7(6), p110.

Morales, R. (2019). *México ingresa al top 10 de exportadores agroalimentarios*. El Economista. Recuperado 28 de enero de 2020, de <https://www.economista.com.mx/empresas/Mexico-ingresa-al-top-10-de-exportadores-agroalimentarios-20190805-0122.html>

Niyogi, Swapan Kumar. 2005. «Shigellosis». *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)* 43 (2): 133-43.

Ocaña-de Jesús, R. L., A. T. Gutiérrez-Ibáñez, J. R. Sánchez-Pale, M. D. Mariezcurrena-Berasain, G. Velázquez-Garduño, A. Laguna Cerda, y I. Rojas Puebla. 2015. «Calidad microbiológica del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) producido bajo condiciones de invernáculo en 5 Municipios del Estado de México». *Phyton (Buenos Aires)* 84 (1): 45-50.



Okhuysen, Pablo C., y Herbert L. DuPont. 2010. «Enteroaggregative *Escherichia Coli* (EAEC): A Cause of Acute and Persistent Diarrhea of Worldwide Importance». *The Journal of Infectious Diseases* 202 (4): 503-5.

Oromí Durich, J. 2002. «Las toxiinfecciones alimentarias como problema de salud pública». *Medicina Integral*, 1-3.

Patel, S., Preuss, C. V., & Bernice, F. (2019). Vancomycin. En *StatPearls*. StatPearls Publishing.

Pearson, Chaurura, B. A. Gash, y M. I. Matsheka. 2014. «*Klebsiella Pneumoniae*: A Potential Food Safety Risk in Wild Fruits and Dried Vegetables in Botswana».

Peterson, Johnny W. 1996. «Bacterial Pathogenesis». En *Medical Microbiology*, editado por Samuel Baron, 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston.

Pazda, M., Kumirska, J., Stepnowski, P., & Mulkiewicz, E. (2019). Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems – A review. *Science of The Total Environment*, 697, 134023.

Qadri, F., Svennerholm, A.-M., Faruque, A. S. G., & Sack, R. B. (2005). Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(3), 465-483.

Quansah, J. K., Escalante, C. L., Kunadu, A. P.-H., Saalia, F. K., & Chen, J. (2020). Pre- and Post-Harvest Practices of Urban Leafy Green Vegetable Farmers in Accra, Ghana and Their Association with Microbial Quality of Vegetables Produced. *Agriculture*, 10(1), 18.

Rabbani, G. H., & Greenough, W. B. (1999). Food as a vehicle of transmission of cholera. *Journal of Diarrhoeal Diseases Research*, 17(1), 1-9.

Radoshevich, Lilliana, y Pascale Cossart. 2018. «*Listeria Monocytogenes*: Towards a Complete Picture of Its Physiology and Pathogenesis». *Nature Reviews. Microbiology* 16 (1): 32-46.

- Rafraf, I. D., Lekunberri, I., Sánchez-Melsió, A., Aouni, M., Borrego, C. M., & Balcázar, J. L. (2016). Abundance of antibiotic resistance genes in five municipal wastewater treatment plants in the Monastir Governorate, Tunisia. *Environmental Pollution*, 219, 353-358.
- Reinthaler, F. F., Posch, J., Feierl, G., Wüst, G., Haas, D., Ruckebauer, G., Marth, E. (2003). Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Research*, 37(8), 1685-1690.
- Rincón V, Gresleida, Messaria Ginestre P, Sonia Romero A, Maribel Castellano G, y Yeiny Ávila R. 2010. «Calidad microbiológica y bacterias enteropatógenas en vegetales tipo hoja». *Kasmera* 38 (2): 97-105.
- Rios S, Agudelo R y Gutierrez L. 2017 Pathogens and microbiological indicators of the quality of water for human consumption: 235-245
- Rodríguez, Diana Marcela, Francy Elaine Torres, Edna Viviana Gutiérrez, Maritza Paola López, Maria Mercedes Martínez, y Ana Karina Carrascal. 2008. «Salmonella Typhimurium determination in compost artificially inoculated in a lettuce crop». *Acta Biológica Colombiana* 13 (3): 61-72.
- Sacristán, Soledad, y Fernando García-Arenal. 2008. «The Evolution of Virulence and Pathogenicity in Plant Pathogen Populations». *Molecular Plant Pathology* 9 (3): 369-84.
- SAGARPA. (2016). SAGARPA. Recuperado el 10 de agosto de 2018, de planeacion agricola nacional 2017-2030: <https://www.gob.mx/sagarpa>
- SAGARPA. (2018). SAGARPA. Recuperado el 17 de octubre de 2018, Anuario Estadístico de la producción agrícola : <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Salud, O. P. (2010). *paho.org*. Recuperado el 25 de Septiembre de 2018, de paho.org: [https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2010/Muestreo\\_ambiental\\_V\\_cholerae.pdf?ua=1](https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2010/Muestreo_ambiental_V_cholerae.pdf?ua=1)
- Sanches, L. A., Gomes, M. da S., Teixeira, R. H. F., Cunha, M. P. V., Oliveira, M. G. X. de, Vieira, M. A. M., ... Knobl, T. (2017). Captive wild birds as reservoirs of

enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC). *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(4), 760-763.

Sharma, A. K., Dhasmana, N., Dubey, N., Kumar, N., Gangwal, A., Gupta, M., & Singh, Y. (2017). Bacterial Virulence Factors: Secreted for Survival. *Indian Journal of Microbiology*, 57(1), 1-

Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M., Roy, S. L....Griffin, P. M. (2011). Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1), 7-15.

Schmidt, V. G., Møllerup, A., Christiansen, E. L., Stahl, M., Olsen, E. J., Angen, Ø. 2015.

Sampling and pooling methods for capturing herd level antibiotic resistance in swine feces

using qPCR and CFU approaches. *PLoS ONE*. 10(6):22.

Schroeder, Meredith, Benjamin D. Brooks, y Amanda E. Brooks. 2017. «The Complex Relationship between Virulence and Antibiotic Resistance». *Genes* 8 (1).

Servais, Pierre, y Julien Passerat. 2009. «Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France)». *Science of The Total Environment* 408 (2): 365-72.

Silva, Anisia J., y Jorge A. Benitez. 2016. «*Vibrio cholerae* Biofilms and Cholera Pathogenesis». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10 (2).

Soni, K. D., and Dubey, K. S. 2014. Phylogenetic analysis of the *Listeria monocytogenes*

based on sequencing of 16S rRNA and *hlyA* genes. *Molecular Biology Reports*. 41:8219-

8229.

Soto Varela, Zamira, Liliana Pérez Lavalle, y Dalidier Estrada Alvarado. 2016. «Bacteria causing of foodborne diseases: an overview at colombia». *Salud Uninorte* 32 (1): 105-22.

Subramanian, K., Selvakkumar, C., Vinaykumar, K. S., Goswami, N., Meenakshisundaram, S., Balakrishnan, A., & Lakshmi, B. S. (2009). Tackling multiple antibiotic resistance in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) clinical isolates: a diarylheptanoid from *Alpinia officinarum* shows promising antibacterial and immunomodulatory activity against EPEC and its lipopolysaccharide-induced inflammation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33(3), 244-250.

Um, M. M., Brugère, H., Kérourédan, M., Oswald, E., & Bibbal, D. (2018). Antimicrobial Resistance Profiles of Enterohemorrhagic and Enteropathogenic *Escherichia coli* of Serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 Compared to *Escherichia coli* Isolated from the Same Adult Cattle. *Microbial Drug Resistance*, 24(6), 852-859.

Talebi, M., Sadeghi, J., Rahimi, F., and Pourshafie, R. M. 2015. Isolation and biochemical fingerprinting of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from meat, chicken and cheese. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 8(4):5.

Thiolas, Aurélie, Claude Bollet, Bernard La Scola, Didier Raoult, y Jean-Marie Pagès. 2005. «Successive Emergence of *Enterobacter aerogenes* Strains Resistant to Imipenem and Colistin in a Patient». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (4): 1354-58.

Ventola, C. Lee. 2015. «The Antibiotic Resistance Crisis». *Pharmacy and Therapeutics* 40 (4): 277-83.

Volkman, H., Schwartz, T., Kirchen, S., Stofer, C., & Obst, U. (2007). Evaluation of inhibition and cross-reaction effects on real-time PCR applied to the total DNA of wastewater samples for the quantification of bacterial antibiotic resistance genes and taxon-specific targets. *Molecular and Cellular Probes*, 21(2), 125-133.

Vidal, M., Kruger, E., Durán, C., Lagos, R., Levine, M., Prado, V., Toro, C., and Vidal,

- Ro. 2005. Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(10):5362-5365.
- Walker, Richard I., Duncan Steele, y Teresa Aguado. 2007. «Analysis of strategies to successfully vaccinate infants in developing countries against enterotoxigenic E. coli (ETEC) disease». *Vaccine* 25 (14): 2545-66.
- Wang, F. R., Cao, W. W., and Cerniglia. E. C. 1997. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *Journal of Applied Microbiology*. 83:727-736.
- Water, P. L. P., & Salts, 2003 B. BD™ MacConkey Agar with Sorbitol.
- Wright, G. D. (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews Microbiology*, 5(3), 175.
- Wintersdorff, Christian J. H. von, John Penders, Julius M. van Niekerk, Nathan D. Mills, Snehal Majumder, Lieke B. van Alphen, Paul H. M. Savelkoul, y Petra F. G. Wolffs. 2016. «Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer». *Frontiers in Microbiology* 7 (febrero).
- Wu, H.-J., Wang, A. H.-J., & Jennings, M. P. (2008). Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(1), 93-101.
- Yang, Shih-Chun, Chih-Hung Lin, Ibrahim A. Aljuffali, y Jia-You Fang. 2017. «Current Pathogenic *Escherichia Coli* Foodborne Outbreak Cases and Therapy Development». *Archives of Microbiology* 199 (6): 811-25.
- Zhang, Shuhong, Guangzhu Yang, Qinghua Ye, Qingping Wu, Jumei Zhang, y Yuanbin Huang. 2018. «Phenotypic and Genotypic Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Isolated From Retail Foods in China». *Frontiers in Microbiology* 9 (marz

## **12. RESUMEN BIBLIOGRÁFICO**

**Zaira Lucero Castro Delgado**

Candidata para el grado de  
Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología

Tesis: PRESENCIA DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS Y GENES DE VIRULENCIA Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN AGUA DE RIEGO EN HUERTAS DE CHIHUAHUA, PUEBLA Y VERACRUZ

Campo de Estudio: Microbiología, control de patógenos transmitidos por los alimentos.

Datos Personales: Nacida en Coscomatepec, Veracruz el 6 de junio de 1994, hija de Marco Antonio Castro Solís y Elia Silvia Delgado Montiel.

Educación: Egresada de la Universidad Veracruzana, grado obtenido Químico

Farmacéutico Biólogo en el 2016 con mención honorífica.

Experiencia Profesional: Laboratorista clínico en el hospital IMSS prospera de Coscomatepec Veracruz del 2015 al 2017.