

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**INFLUENCIA DE LA DIETA Y EL AMBIENTE EN LA
SELECCIÓN DE LINAJES DE *ESCHERICHIA COLI*
COMENSAL EN EL INTESTINO DE POLLOS DE ENGORDE.**

Daniela Sofía García Cando

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
INGENIERA EN PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS

Quito, 4 de mayo de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Influencia de la dieta y el ambiente en la selección de linajes de *Escherichia coli* comensal en el intestino de pollos de engorde.

Daniela Sofía García Cando

Nombre del profesor, Título académico

Gabriel Trueba, PhD.

Quito, 4 de mayo de 2020

DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Nombres y apellidos: Daniela Sofía García Cando

Código: 130490

Cédula de identidad: 1725486524

Lugar y fecha: Quito, mayo de 2020

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETheses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETheses>.

RESUMEN

El uso indiscriminado de antibióticos tanto en las industrias (farmacéutica, agrícola, ganadera, etc.) como en la medicina, ha llevado al desarrollo y rápida propagación de bacterias multirresistentes, que amenazan a la salud pública. Estas bacterias poseen elementos de resistencia que son genes que se transfieren horizontalmente entre bacterias que comparten ambiente. Estos genes son resultado de mutaciones y de la exposición prolongada a antibióticos. *Escherichia coli* juega un rol importante en la propagación de genes de resistencia tanto con bacterias comensales como intestinales, por sus características como una alta tasa de transferencia horizontal de genes junto con una alta capacidad para sobrevivir y reproducirse al aire libre juega, además que tiene la capacidad de colonizar el intestino de una gran variedad de animales homeotermos. Nuestro estudio se enfocó en comprender si disminuir el uso de antibióticos junto con un cambio en el ambiente nutricional afectará la capacidad metabólica de *Escherichia coli* particularmente de aquellas que poseen elementos de resistencia. Para comprobarlo se llevó a cabo un experimento en el que se cambió la dieta a pollos de engorde de la variedad Ross en dos etapas. En la primera etapa, las 3 primeras semanas de vida de los animales, se los crió en un mismo ambiente y se los alimentó con la dieta A, después se los separó en 4 grupos de 25 individuos cada uno, que diferían por el ambiente (Sitio 1 y 2) y la dieta (Dieta A y B) con la que fueron alimentados. El experimento finalizó a las 6 semanas de vida de los animales. Se realizó 2 muestreos (3 y 6 semanas), y se aisló 389 cepas, a las que se les realizó antibiogramas. Se secuenció el gen *fum C* a 250 cepas, de ellas solo a 28 se les realizó MLST. La información obtenida se analizó estadísticamente con PCA y X^2 . Al concluir el experimento si bien aumentó la sensibilidad en todas las poblaciones a las seis semanas, persiste la resistencia a antibióticos. Esto es causado por una serie de procesos que no podemos controlar. Además, la flexibilidad fenotípica de las bacterias comensales, hace que sea difícil controlar la propagación de bacterias resistentes.

Palabras clave: *Escherichia coli*, pollos de engorde, resistencia a antibióticos, bacterias multirresistentes.

ABSTRACT

The misuse of antibiotics leads to the emergence of multidrug-resistant bacteria, that are a serious threat to modern medicine since they cause deadly infections. MDR bacteria have genes that encode cellular mechanisms used by bacteria to inactivate antibiotics or avoid their action. Horizontal gene transfer is a process used by bacteria to share genes between commensal or environmental bacteria. Because *Escherichia coli* has a high horizontal transfer rate, it plays a key role in MDR gene propagation, and it can colonize the intestine of a great diversity of warm blood animals. Furthermore, *Escherichia coli* can survive and reproduce for long periods in aerobic environments. On the other side, the poultry industry works with high-performance chickens. These chickens have been feeding with diets of corn and soy for years. In the intestine, soy and corn degrade on simple carbohydrates, and they became microbiota's preferential substrate. Thus, the microbiota got genes and antibiotic-resistant genes, that are prosperous or neutral in this nutritional environment. Antibiotic-resistant genes act over the metabolic performance of bacteria by limiting their growth rate and fitness. If we change chicken's diet, the nutritional environment also does. Then, bacterial fitness could be affected by these changes? Or these could decrease antibiotic-resistant bacteria? To study this, we changed the diet of a group of broiler chickens in two phases. In the first phase, we feed the chickens with a diet of corn and soy, while they were raised in environment 1 (USFQ animal facility). The first phase lasted three weeks, then we did the first sampling. In the second phase, we separated the chickens into four groups: environment 1 diet A, environment 1 diet B, environment 2 diet A, and environment 2 diet B. The second phase lasted three weeks, then we did the second sampling. At the end of the experiment, we isolated 389 strains, and we made antibiograms. Later we extracted DNA, amplified the *Fum C* gene of 250 strains, and did MLST of 27 of them. We used PCA and chi-squared to analyze the information. Despite, antibiotic susceptible bacteria increased in all the populations, antibiotic-resistance persisted in all the populations. Antibiotic-resistance persistence is caused by phenotypic versatility, which improves bacterial performance in every nutritional environment.

Key words: *Escherichia coli*, poultry, antibiotic resistance, multi-drug resistant bacteria.

TABLA DE CONTENIDOS

1	INTRODUCCIÓN.....	11
1.1	Los antibióticos y su funcionamiento.....	11
1.2	El fenómeno de las bacterias multirresistentes	11
1.3	<i>Escherichia coli</i> y la propagación de bacterias multirresistentes.....	13
1.4	<i>Escherichia coli</i> y su relación con los pollos de engorde	14
1.5	Especialización de la microbiota y pleiotropía antagonista	14
2	MÉTODOS.....	17
2.1	El experimento	17
2.2	Muestras	17
2.3	Evaluación fenotípica de la susceptibilidad antimicrobiana	18
2.4	Análisis molecular.....	18
2.5	Análisis estadísticos	19
3	RESULTADOS	20
4	DISCUSIÓN.....	24
4.1	Tasa de recambio.....	24
4.2	Persistencia de la resistencia	24
4.3	Alternativas para controlar la propagación de bacterias resistentes.....	26
4.4	Limitaciones del MLST y del experimento.....	26
5	CONCLUSIONES.....	28
6	REFERENCIAS	29
	ANEXO A: RESULTADOS.....	35

ANEXO B: METODOLOGÍA PARA MLST.....	41
fum C.....	41
adk.....	41
mdh.....	42
pur A.....	42
rec A.....	42
gyr B.....	43
icd.....	43
ANEXO C: REACTIVOS PCR.....	45
ANEXO D: AUTORIZACIÓN COMITÉ DE BIOÉTICA USFQ.....	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis de X^2	36
Tabla 2. Análisis de X^2 -diversidad de fenotipos.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje de individuos por cada fenotipo de resistencia a antibióticos.	37
Figura 2. Proporciones de alelos fum C en las poblaciones estudiadas.....	38
Figura 3. Análisis de Componentes Principales:.....	39
Figura 4. Cladograma secuencias de MLST:.....	40

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Los antibióticos y su funcionamiento

Los antibióticos fueron descubiertos a inicios del siglo XX y revolucionaron la medicina al aumentar la expectativa de vida de millones de personas (Lee, 2015). Según su modo de acción se clasifican en: bactericidas y bacteriostáticos. Los que poseen efecto bactericida, matan a las bacterias; mientras que los bacteriostáticos, inhiben su proliferación (Mehdi, et al., 2018). Los antibióticos actúan bloqueando o deteniendo procesos fundamentales para la célula como la síntesis de ADN (quinolonas, sulfamidas), síntesis de proteínas (tetraciclinas, anfenicoles, aminoglucósidos, lincosamidas, macrólidos); o al inhibir la síntesis de la pared celular (betalactámicos, glucopéptidos) (Esparza , 2008). Las bacterias de forma intrínseca, no causada por mutaciones o transferencia horizontal de genes, poseen resistencia a ciertas familias de antibióticos. Es causada por diferencias en la permeabilidad de la membranas y bombas de eflujo que eliminan estas sustancias (Morgan , et al., 2019). Por ejemplo las Gram negativas al tener una membrana celular externa de lipopolisacáridos no son susceptibles a glucopéptidos como la vancomicina, ya que por sus propiedades químicas no atravesarán la membrana (Miller, 2016).

1.2 El fenómeno de las bacterias multirresistentes

Sin embargo, debido al uso inadecuado e indiscriminado de los antibióticos, la humanidad afronta un reto de salud pública importante: la aparición y propagación de bacterias multirresistentes; las infecciones causadas por estas bacterias MDR (*multi drug resistant*) son peligrosas por la limitada disponibilidad de agentes para tratarlas, lo que puede tener consecuencias fatales (Morgan , et al., 2019). Entre los usos inadecuados que se hace de los antibióticos, el que nos concierne en este estudio es la administración a pollos de engorde para consumo humano (Parsonage, et al., 2017). Hay que considerar que la industria avícola es una de las más grandes y con mayor crecimiento a nivel mundial, debido a que la demanda por

productos primarios (carne y huevos) aumenta a la par con el crecimiento poblacional; solo en 2018 la producción de carne de pollo a nivel mundial se aproximó a las 90 billones de toneladas (Agyare, Etsiapa, Ngofi, & Boateng, 2019). Para aumentar la producción se implementan antibióticos como agentes promotores de crecimiento o profilácticos, que reducen el riesgo de propagación de enfermedades en galpones, para que los animales alcancen un peso ideal en menos tiempo, reduciéndose costos veterinarios y pérdidas (Mehdi et al., 2018). En muchos países se implementa una amplia diversidad de antibióticos al criar pollos de engorde, entre ellos antibióticos que también se utilizan en humanos como: colistina, tetraciclina, sulfamidas, quinolonas, etc. (Agyare et al., 2019). Por ello a nivel mundial se busca regular el uso veterinario de antibióticos, procurando que no se utilice en animales lo mismo que en humanos (Morgan et al., 2019).

Las bacterias MDR adquieren genes de resistencia mediante transferencia horizontal de genes y mutaciones. La transferencia horizontalmente ocurre por tres procesos: transducción (mediada por fagos), transformación (permeabilidad de la membrana para captar ADN exógeno) y conjugación (por pili sexual), al insertarse los genes en elementos móviles como plásmidos y transposones (Madigan, Martinko, Bender, Buckley, & Stahl, 2015). En el caso de las mutaciones hay que recordar que las bacterias se reproducen de forma clonal por división celular, es decir las células hijas poseen copias fieles del genoma lo que las hace clones del progenitor, no obstante, cada cierto tiempo ocurren errores al azar durante la replicación, o mutaciones, que pueden asociarse con resistencia a antibióticos (Melnyk, Wong, & Kassen, 2014).

Las bacterias que poseen estos elementos y estas mutaciones, al ser poco frecuentes están presentes en un pequeño porcentaje de la población, pero pueden aumentar si la presión ambiental así lo demanda; es decir que la presencia de antibióticos en el microbioma otorgará a las bacterias MDR una ventaja adaptativa lo que hará que proliferen (Andersson & Hughes,

2011). Por otra parte, los genes responsables de la resistencia codifican para mecanismos como: cambios en la pared para reducir su permeabilidad; cambios en el diámetro del poro; sobreexpresión del sitio diana del antibiótico; o enzimas que inactivan al antibiótico, etc. (Miller, 2016). Estos mecanismos tienen costo energético asociado que limitará el crecimiento y aptitud ecológica de las bacterias (Melnyk et al., 2014).

1.3 *Escherichia coli* y la propagación de bacterias multirresistentes

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa, fermentadora de lactosa y aerobia facultativa, que presenta una dualidad entre: bacteria comensal y patógena; que es causada por su enorme flexibilidad genotípica (Conway & Cohen , 2015). Como bacteria comensal: *Escherichia coli* posee la habilidad de colonizar el intestino de una gran variedad de animales homeotermos¹; participando en la absorción de nutrientes, obtención de vitaminas como la vitamina K, además de participar en tolerancia inmunitaria, y competir contra bacterias patógenas evitando su colonización (Madigan et al., 2015). Como bacteria patógena, debido a su flexibilidad genotípica ganará elementos móviles accesorios que codifican para factores de virulencia, que podrían afectar la funcionalidad de órganos causando la muerte del hospedero (Porse , et al., 2017). Es esta misma flexibilidad genotípica la que hace a *Escherichia coli* especialista en transferencia horizontal de genes, como consecuencia se cree que tiene un rol protagónico en la propagación de elementos de resistencia entre bacterias comensales y ambientales (Porse , et al., 2017). Además, al ser una bacteria aeróbica facultativa puede sobrevivir, aproximadamente por 48 horas; y reproducirse, hasta alcanzar una gran densidad poblacional, al ser expulsados en las heces, lo que les permite transferir de forma acelerada elementos de resistencia con bacterias ambientales (Barrera, Cardenas, Graham , & Trueba , 2019).

¹ Animales que han desarrollado comportamientos o mecanismos fisiológicos para mantener una temperatura constante, a pesar de habitar un ambiente con cambios abruptos de temperatura (Gordon , 2008).

1.4 *Escherichia coli* y su relación con los pollos de engorde

Escherichia coli es una bacteria comensal del intestino de los pollos de engorde, pero ciertos patotipos pueden causar serias infecciones oportunistas como: colibacilosis y colisepticemia; que si no son tratadas a tiempo y de forma apropiada causarán una falla sistémica que matará al individuo (Tufany, Shukla, & Kumar, 2011). La colibacilosis se origina cuando *Escherichia coli* comensal coloniza tejidos lesionados o llega a infectar a individuos inmunocomprometidos (Gibert , 2010). Se debe considerar, que otro tipo de colibacilosis comenzarán como infecciones intestinales y cloacales ocasionadas por cepas de patógenas de *Escherichia coli* como APEC (Avian Pathogenic *Escherichia coli*) (Tufany et al., 2011). Mientras que la colisepticemia afectará a individuos jóvenes durante sus primeras seis semanas de vida aumentando la tasa de mortalidad en pollos jóvenes; el contagio ocurrirá cuando la bacteria atraviesa la cáscara del huevo, esto ocurre si este está expuesto a heces o condiciones de insalubridad que permiten el contacto directo con la bacteria (Gibert , 2010). Entre otras enfermedades causadas por *Escherichia coli* están la peritonitis, coligranuloma, salpingitis, enfermedad de saco aéreo, sinovitis, etc. (Tufany et al., 2011).

1.5 Especialización de la microbiota y pleiotropia antagonista

Por otra lado, los pollos de engorde han sido alimentados por años con balanceado comercial, cuyos componentes mayoritarios son: maíz (60%) y soya triturada (31%) (Avila & Benavides, 2013). El maíz es rico en azúcares sencillas como: almidón, fructosa, glucosa y sacarosa; que representarán el 70% de su peso seco (Hamid, et al., 2014). Mientras que la soya, posee un 16,6% de azúcares como: fructosa, glucosa, rafinosa y estaquiosa (Hou, Chen, Shi , Zhang, & Wang , 2008). Estos azúcares se liberarán al degradarse la soya y el maíz en el intestino del pollo, creando un ambiente nutricional para el cual la microbiota se ha especializado, perfeccionando su habilidad para metabolizarlos, convirtiéndolos en su sustrato preferencial y adquiriendo genes y elementos de resistencia favorables o neutros (Cooper & Lenski, 2000).

Sin embargo, la aptitud ecológica de las bacterias que poseen estos genes (particularmente estos elementos de resistencia) podría afectarse al cambiar el ambiente nutricional, por un fenómeno conocido como pleiotropía antagonista (Sane, Miranda, & Agashe, 2018). La pleiotropía antagonista establece que a lo largo del proceso de especialización de los organismos a un ambiente, se fijarán genes que favorecerán su adaptación. Junto con estos genes, por el desequilibrio de ligamiento, se heredarán genes neutrales en el ambiente de generación en generación (Cooper & Lenski, 2000). Pero, si estas poblaciones altamente especializadas, llegan a cambiar de ambiente existe la posibilidad de que su aptitud ecológica se vea afectada por los genes que permitieron su adaptación y por aquellos que eran neutros en el ambiente inicial (Sane et al., 2018). Esto incluye a los elementos de resistencia, quienes representará un costo energético significativo para la bacteria, sin embargo son necesarios para sobrevivir en un ambiente con antibióticos (Andersson & Hughes, 2011). A todo esto, se cree que al retirarse el antibiótico, ya no existirá una presión ambiental, por lo que las bacterias ya no necesitan estos elementos metabólicamente costosos. Las bacterias MDR se verán desfavorecidas disminuyendo en la población, en contraste las bacterias sensibles aumentarán (Melnik et al., 2014). Por ello una estrategia muy utilizada para controlar y reducir la propagación de las bacterias resistentes consiste en disminuir o no utilizar antibióticos (Agyare et al., 2019). Sin embargo, se ha observado persistencia de bacterias comensales resistentes en ambientes libres de antibióticos, esto puede ser ocasionado por fenómenos no controlables como mutaciones causantes de resistencia libre de costo energético, o mutaciones que compensan el gasto energético, etc.; lo que hace que deshacerse de los elementos de resistencia no afecte positivamente el fitness² (Melnik et al., 2014). Y las Enterobacteriaceae, particularmente

² Es el término que se utiliza para referirse a la aptitud de un genotipo en un ambiente. Si este es exitoso o positivo tendremos un organismo adaptado al ambiente, lo que le permitirá sobrevivir y reproducirse (Ginnobili, 2013).

Escherichia coli, han demostrado tener una gran capacidad para generar mutaciones que compensan el gasto energético, lo que les permite ser competitivas (Porse , et al., 2017).

Sin embargo, todavía no se sabe qué pasará con la *Escherichia coli* comensal de los pollos de engorde en un ambiente nutricional no favorable. Por ello, cambiamos de la dieta A: maíz y soya, a la dieta B: alfalfa. La dieta B, desarrollada por los investigadores, que posee un 98% de alfalfa. La alfalfa posee 24% de celulosa y 18% de hemicelulosa; que se degradarán en las azúcares complejas: xilosa, arabinosa, mannososa, galactosa, glucosa y ramnosa (Wedig , Jaster, & Moore, 1986). Estas azúcares no son el sustrato preferencial de la microbiota, por lo que pondrán a prueba a la *Escherichia coli* comensal (Sane et al., 2018). El objetivo de nuestra investigación fue determinar si un cambio en el ambiente nutricional afectará la aptitud ecológica de *Escherichia coli* comensal, particularmente de la que posee elementos de resistencia a antibióticos. También, postulamos que el cambio de dieta causará una alta tasa de recambio de linajes dentro del intestino de los pollos de engorde, lo que podría disminuir los linajes resistentes a antibióticos (Sane et al., 2018). Se debe aclarar que no suministramos antibióticos a los pollos, para estudiar solo el efecto de la dieta en los genes de resistencia. Por ello, estos genes son neutros a la selección, lo que hace que sea interesante estudiar sus proporciones en las diferentes poblaciones de la investigación. Tampoco identificamos secuencias de ADN que codifican para resistencia a antibióticos.

2 MÉTODOS

2.1 El experimento

Los factores: dieta y ambiente fueron modificados. La dieta para observar su influencia sobre la aptitud ecológica de la microbiota, y el ambiente para descartar su influencia en la microbiota. Las variables de respuesta analizadas fueron: longitud de los halos en los antibiogramas, alelos para el gen *fum C* y STs del MLST. El proyecto contó con el permiso del comité de bioética para trabajo con animales de la Universidad San Francisco de Quito. Los investigadores fueron capacitados por el personal veterinario de la industria de producción de aves de engorde. Al inicio se recibió 100 pollos de engorde de la variedad Ross, donados por la Empresa Avicultora. Todos fueron vacunados contra: Marek, New Castle, Bronquitis, etc.; acorde con los protocolos de manejo de la industria. Durante el experimento se mantuvo condiciones ambientales de aireación, temperatura y limpieza constante, así como suministro de agua y alimento “*at libitum*”. Tanto los pollos al finalizar el experimento (como en caso de enfermedad) eran revisados por un veterinario y si el caso lo ameritaba, eran sacrificados. En la primera parte del experimento los animales estuvieron en el mismo corral (con un diámetro de 2 metros) en el bioterio de la universidad (Sitio 1), recibiendo la Dieta A. A las 3 semanas se realizó el primer muestreo y se dio inicio a la segunda parte del experimento. Para esto se separó a los animales en dos ambientes: Bioterio USFQ (Sitio 1) y Valle (Sitio 2); cada grupo con 50 individuos. En ambos sitios se dividió a los animales en dos grupos, cada uno de 25 individuos, según la dieta: balanceado comercial (Dieta A) y modificada (Dieta B). La dieta modificada consistía en pellets y harina de alfalfa, con vitaminas para evitar enfermedades metabólicas. Después de tres semanas se realizó el último muestreo y concluyó el experimento.

2.2 Muestras

Para muestrear se utilizó cajas de cartón cubiertas con papel periódico, se colocó un animal por caja, y se los mantuvo en ellas hasta obtener la muestra de heces, que fue recolectada en un

criovial de 2mL utilizando hisopos estériles. Las heces fueron congeladas a -80°C , mientras que los hisopos se llevaron al laboratorio para aislar *Escherichia coli* por agotamiento utilizando el agar Mac Conkey Lactosa. A las 24 horas, se aisló 5 colonias lactosa + de cada caja, se obtuvo 389 colonias, y cada una se inoculó en un criovial de 2mL con TSB (*Tryptic Soy Broth*) y 15% de glicerol, se incubaron por 18h a 38°C . Con un hisopo se tomó un poco y se hizo un McFarland 0.5 para realizar un antibiograma. Después, los tubos fueron congelados a -80°C para estudios posteriores.

2.3 Evaluación fenotípica de la susceptibilidad antimicrobiana

De cada colonia se realizó antibiograma por la técnica de Kirby-Bauer, siguiendo las recomendaciones de la CLSI (*Clinical & Laboratory Standards Institute*) y se utilizó el medio Muller Hinton. Se utilizó los siguientes antibióticos, por ser los más usadas en humanos: TET-tetraciclina(30 μg), AMP-ampicilina(10 μg), CF- cefazolina(30 μg), CHLOR-cloranfenicol(30 μg), CTX- cefotaxime(30 μg), CAZ- ceftazidime(30 μg), FEP-cefepime(30 μg), IMP – imipenem(5 μg), CIP- ciprofloxacina(5 μg), GN- gentamicina(10 μg), AMC-amoxicilina y ácido clavulánico(20/10 μg) y SXT- trimetoprim sulfamethoxazole(1.25/23.75 μg). Para determinar perfiles de resistencia se midió los halos y se creó una matriz en Microsoft Excel, para buscar si existe asociación con los factores dieta y ambiente.

2.4 Análisis molecular

Las colonias aisladas en el muestreo 1 y 2 fueron procesadas para liberar el ADN por la técnica de hervido (Seni, 2015). Para ello con un hisopo se tomó varias colonias y se las diluyó en 1mL de agua libre de DNasa de *BioLabs*, en un tubo Eppendorf de 2ml. Más adelante, se hirvió los tubos por 10 min y se los centrifugó por 5 min a 93g. Se midió la calidad del ADN utilizando un Nanodrop de ThermoScientific. Después se tomó alícuotas del ADN y se amplificó por PCR convencional el gen *fumC* en 109 cepas utilizando *Master Mix Go Taq*, siguiendo el protocolo

del Anexo B y C. Lo mismo se hizo con otras 27 cepas escogidas al azar y se amplificó por PCR todos los genes del MLST (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *pur A* y *recA*) (ver Anexo B y C). Más adelante se tomó alícuotas de los amplicones, se las cargó en un gel de agarosa al 1% y se hizo una electroforesis para comprobar el tamaño de los amplicones y luego se los envió a secuenciar. Una vez que se obtuvo la información de la secuencias se las cargó a la base de datos de MLST (*Enterobase* Project) y se identificó los alelos para todos los genes secuenciados.

2.5 Análisis estadísticos

Con la información de los perfiles de sensibilidad y resistencia a antibióticos se realizó un análisis de Componentes Principales en R (utilizando el paquete *ade4*) y Minitab 19. Con esta información, también, se hizo un análisis de X^2 , analizando los factores dieta y ambiente para ello se utilizó el software XLSTAT. Por otra parte, con la información genotípica, es decir con las proporciones de alelos de *fum C* se generó gráficos de barras con fines descriptivos, lo mismo con las proporciones de resistencia a los 12 antibióticos utilizados. Finalmente, las secuencias de los genes del MLST fueron concatenadas en este orden: *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *pur A* y *recA*; utilizando *Notepad++*. Todas las secuencias resultantes fueron alineadas utilizando el software MEGA versión X (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, & Tamura, 2018). Después con esta información se generó un cladograma utilizando métodos bayesianos en *BEAUti* y *Beast* versión v1.8.4, 2002-2016 (Drummond, Rambaut, Suchard, & Xie, 2020). En *TreeAnnotator* v1.8.4 se usó el algoritmo *Maximum Clade Credibility Tree* estableciendo un *Burn-in* del 20%. El documento generado se abrió en *TreeAnnotator* y en *FigTree* versión v1.4.4, para editar el árbol y se añadió otros detalles utilizando Microsoft Publisher.

3 RESULTADOS

En el muestreo 1 de las 200 cepas, solo se realizó antibiograma a 189 (4 completamente sensibles y 185 resistentes). Mientras que en el muestreo 2, se obtuvo 200 cepas (50 de cada grupo). El número de bacterias sensibles y resistentes variaron en los grupos estudiados: en el grupo 1 sitio 1 dieta A (17 sensibles y 33 resistentes), grupo 2 sitio 1 dieta B (12 sensibles y 28 resistentes), grupo 3 sitio 2 dieta A (3 sensibles y 47 resistentes) y grupo 4 sitio 2 dieta B (7 sensibles y 43 resistentes).

Con esta información, primero, se realizó análisis de X^2 utilizando el número de individuos susceptibles y resistentes a antibióticos (Tabla 1. Anexo A). Para estudiar la influencia de la variable ambiente se utilizó la información del muestreo 2 y se comparó el sitio 1 vs sitio 2, como se observa en la columna a de la tabla 1, hay una diferencia estadísticamente significativa entre el número de individuos susceptibles y resistentes, para los antibióticos: TET y AMC, considerando que $p \leq \alpha$ (0,05). En el sitio 1, hay un mayor número de individuos sensibles a TET. Mientras que para AMC, hay un mayor número de individuos susceptibles en el sitio 2. Por otra parte, para analizar la influencia de la dieta se realizó el mismo análisis con los datos del muestreo 2 pero comparando la dieta A con la dieta B, como se observa en la columna b de la tabla 1 no se encontró diferencias estadísticamente significativas para ningún agente antibiótico en el número de individuos susceptibles y resistentes.

Segundo, se analizó con X^2 los fenotipos únicos y compartidos, en las poblaciones estudiadas considerando la influencia de la dieta, el ambiente y el tiempo (Tabla 2. Anexo A). Para analizar influencia del ambiente, se comparó los fenotipos compartidos y únicos entre el sitio 1 y 2 en el muestreo 2. Como se puede ver en la columna a de la tabla 2., no se encontró una diferencia estadísticamente significativa considerando que $p \geq \alpha$ (0,05). Por otra parte, para analizar la influencia de la dieta, comparamos los fenotipos compartidos y únicos entre la dieta A y B en el muestreo 2. Como se puede ver en la columna b de la tabla 2., tampoco se encontró una

diferencia estadísticamente significativa considerando que $p \geq \alpha (0,05)$. Sin embargo, cuando se analizó los fenotipos únicos y compartidos entre las cepas del mismo sitio, sitio 1, pero en dos periodos de tiempo diferentes: 3 semanas (muestreo 1) vs. 6 semanas (muestreo 2); cómo se puede ver en la columna c de la tabla 2, si se observó una diferencia estadísticamente significativa, considerando que $p (0,0002) \leq \alpha (0,05)$. Esto nos indica que la diversidad de fenotipos únicos de resistencia disminuyó a lo largo del tiempo, sin que se registre diferencias sobresalientes entre los fenotipos únicos al considerar dieta y ambiente. Esta disminución en la diversidad de fenotipos se relaciona una alta tasa de recambio en la microbiota, esto se discutirá más adelante.

Tercero, para identificar la resistencia a antibiótico más abundante en las poblaciones estudiadas, realizamos gráficos de barras (Figura 2. Anexo A). En el gráfico A se observa que los elementos de resistencias a: TET, AMP, SXT, CIP y CHLOR; son persistentes en todas las poblaciones estudiadas: muestreo 1 sitio 1 dieta A, muestreo 2 sitio 1 dieta A y dieta B, muestreo 2 sitio 2 dieta A y dieta B. Mientras que en el gráfico B, al comparar el muestreo 1 con el muestreo 2, considerando las dietas A y B, se encontró que las resistencias con mayor incidencia en el muestreo 1 dieta A son: TET (10%) junto con TET SXT (18%). Mientras que para muestreo 2 dieta A los fenotipos más frecuentes son: sensibilidad completa (20%) seguido por la resistencia a TET (18%). En el muestreo 2 dieta B los fenotipos más frecuentes son: sensibilidad (19%) y la resistencia a TET AMP (16%) (Fig 2. Anexo A). Es decir que a pesar de que se retiró los antibióticos, y de que aumento la sensibilidad de antibióticos para ambas dietas en el muestro 2, persistió la resistencia a antibióticos, siendo la resistencia a TET y AMP las más persistentes, esto discutiremos más adelante.

En cuanto a la información molecular, se amplificó el gen *fum C* en todas las cepas aisladas durante el experimento, pero se obtuvo muy pocas secuencias de calidad. Con esto nos referimos a secuencias en las que cada nucleótido tenía un nivel de confianza superior al 50%,

y una longitud que permitiera identificarla en la base de datos de MLST (*Enterobase Project*). En el caso del muestreo 1 solo 109 secuencias de calidad. En el muestreo 2 se obtuvo secuencias de calidad en el grupo 1 solo de 21 cepas, grupo 2 de 27 cepas, grupo 3 de 48 cepas y grupo 4 de 5 cepas. Por otra parte, se realizó MLST³ de 27 cepas de ambos muestreos, escogidas al azar.

Con esta información, primero se hizo un gráfico de barras con los alelos identificados para el gen *fum C* (Fig 2. Anexo A) y se observa que el alelo 11 es dominante en todas las poblaciones estudiadas. Segundo, utilizando los alelos del gen *fum C* y la información de la longitud de los halos de los antibiogramas, se realizó un análisis de PCA (Gráfica a, de la Fig3. Anexo A). No se obtuvo ningún agrupamiento o “patrón” especial, al contrario todos los puntos se sobreponen. Lo que nos está indicando que las variables analizadas son muy diversas y nuestro análisis fracasa en explicar esta enorme diversidad, una prueba de ello es que los dos primeros componentes solo explican el 42,93% de la diversidad y para que considerar un PCA significativo los dos primeros deben explicar mínimo el 80% de la diversidad (Jolliffe & Cadima, 2016). Por otra parte, al revisar la gráfica de influencia (Gráfica B, de la Fig3. Anexo A) se observa que la variante gen *fum C* está próxima a cero, lo que indica que esta variante tiene poca influencia sobre los componentes principales, por lo que la variable puede ser retirada del PCA y este no se vería afectado (Jolliffe & Cadima, 2016).

Tercero, con las secuencias de los genes del MLST concatenadas se generó un cladograma (Fig 4. Anexo A). Sin embargo, no se observó agrupaciones de clusters por ninguno de los factores de interés: dieta y ambiente, ni siquiera por el tiempo. Esto nos indica que hay mucha diversidad

³ MLST (*Multi Locus Sequence Typing*) Técnica de biología molecular para identificar filogrupos dentro de una misma especie de bacteriana. Para ello se amplifican de 7 a 10 housekeeping genes, genes que codifican para procesos clave, y que no tolerarán una alta tasa de mutación; pero que registran pequeños polimorfismos (de 1 a 27 nucleótidos) que indican divergencia de todo el genoma. En base a la combinación de alelos se asigna un ST (*Sequence Type*) (Pavón & Maiden , 2014).

en las cepas analizadas, entonces se descartar el factor dieta y ambiente, pero esta información debe ser tomada con muy cuidado, más adelante se discutirá esto.

4 DISCUSIÓN

4.1 Tasa de recambio

Primero, hay que recordar que en ecología la tasa de recambio poblacional hace referencia a que la composición de especies dentro de una comunidad no permanece inalterada a lo largo del tiempo, sino que esta se modifica por procesos evolutivos como: mutaciones, deriva génica, selección natural, etc., la frecuencia con la que estos ocurren definirá la velocidad, o “tasa”, a la que se perderán o ganarán nuevas especies (Valverde , Meave , Carabias, & Cano-Santana, 2005). Con las bacterias pasa algo similar, pero puede ser más rápido, considerando que procesos como la transferencia horizontal de genes (Papke & Gogarten, 2012) y procesos de metilación selectiva de genes, son impulsado por factores ambientales más variables, que generan estrés en la microbiota y que permiten que surjan nuevos linajes en las especies bacterianas de la microbiota (Cota, et al., 2016). Los factores ambientales que afectan a la microbiota son: cambio en la disponibilidad de nutrientes (por cambios en la dieta), cambios hormonales y en la regulación del sistema inmune del hospedero (Diarra, et al., 2007). Estos cambios ocurren de forma muy acelerada en la vida de los pollos de engorde, al ser animales de vida corta (Diarra, et al., 2007). Esto explica porque disminuyó la diversidad de fenotipos de resistencia al comparar las cepas del muestreo 1 con las del muestreo 2 (Tabla 2, Anexo A) y el aumento en los fenotipos de sensibilidad en el muestreo 2 para ambas dieta (Gráfica a, Fig. 2, Anexo A).

4.2 Persistencia de la resistencia

Segundo, la persistencia de la resistencia en las poblaciones es causada por procesos no controlables. Uno de ellos es elementos de resistencia ligados a marcadores de selección favorecidos por el nuevo ambiente, ocurriendo pleiotropia sinérgica ya que las características que en un ambiente eran neutras en otro aumentan el *fitness* (Cooper & Lenski, 2000). Estos genes están en elementos móviles como plásmidos y transposones lo que facilita su

transferencia horizontal. Mientras que los marcadores de selección incluyen tolerancia a metales pesados y modificaciones fisiológicas para compensa el gasto energético (Andersson & Hughes, 2011). Otro proceso es la aparición de elementos de resistencia que no tienen costo metabólico y de mutaciones compensatorias del gasto energético. Estas mutaciones se han observado en bacterias tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* en humanos (Melnik, McCloskey, Hinz, Dettman, & Kassen, 2017). Estas mutaciones son favorecidas; y al tener un costo energético reducido, es poco probable que se reviertan (Andersson & Hughes, 2011). La resistencia a TET y AMP son de las más comunes en las bacterias comensales. La resistencia a TET es causada por genes que codifican para bombas de eflujo que eliminan esta sustancia y son libres de costo energético (Karami, Nowrouzian, Adlerberth, & Wold, 2006). Por otra parte la resistencia AMP se relaciona con genes que confieren resistencia y están rodeados por secuencias de integrones, siendo muy comunes entre las Enterobacteriaceae (White, Mclever, & Rawlinson, 2001).

Pero no solo esto hará que persista la resistencia a antibióticos, también debemos mencionar que en estudios previos sobre la capacidad metabólica de *Escherichia coli* se encontró que las cepas comensales, en contraste con las patógenas, son más flexibles fenotípicamente al momento de utilizar diferentes nutrientes como fuente de energía (Monk, et al., 2013). Esta versatilidad está relacionada con la sinergia e intensa competencia a la que se han acostumbrado las cepas comensales al vivir en el intestino de los animales homeotermos, lo que ha permitido que a partir de rutas metabólicas centrales se deriven rutas alternas que permiten utilizar otro tipos de sustratos sin que la aptitud ecológica se afecte (Monk et al., 2013). Como consecuencia las cepas comensales a pesar de poseer estos elementos de resistencia conservarán su competitividad y podrán adaptarse exitosamente a cualquier ambiente nutricional, todo esto nos indica que disminuir el número de individuos resistentes y conseguir una población homogénea, conformada solo por individuos susceptibles, tomará más

tiempo y generaciones de las esperadas, además, reducir el uso de antibióticos, no debe usarse como única estrategia (Gelder , et al., 2004).

4.3 Alternativas para controlar la propagación de bacterias resistentes

Entonces, al considerarse estrategias de control de propagación de bacterias resistentes, hay que recordar que los elementos de resistencia solo representan un costo energético o metabólico a la bacteria, si esta se encuentra en un ambiente libre de antibióticos, lo que es prácticamente imposible (Schulz , Engelstädter, & Bonhoeffer, 2010). En el ambiente se ha detectado concentraciones de antibióticos menores a la concentración mínima inhibitoria (*MIC*) consecuencia de contaminación antropogénica (Andersson & Hughes, 2011). Esta concentración de antibióticos pese a ser baja ha demostrado ser significativa para favorecer la proliferación de bacterias MDR junto con sensibles, permitiendo la libre transferencia horizontal de elementos de resistencia (Bengtsson-Palme & Joakim, 2016). Se propone que una mejor estrategia para controlar a las bacterias MDR y su propagación ambiental es calcular la concentración mínima de selección, que para varios agentes antibióticos se ha estimado es menor a la *MIC* (Khan , Beattie, & Knapp, 2017). Es complicado identificar todos los factores ambientales que influyen en la aparición de bacterias multirresistentes, ya que no solo dependerá de la concentración del antibiótico, también dependerá del tiempo de exposición, la competencia bacteriana, nutrientes, etc. (Leisner, Jørgensen, & Middelboe, 2016).

4.4 Limitaciones del MLST y del experimento

En cuanto al análisis por MLST, lo aplicamos en el estudio porque este es el método estándar para caracterizar cepas bacterianas tanto en epidemiología como en investigación evolutiva. Es una metodología muy útil al poseer bases de datos que permiten comparar y transferir información epidemiológica (Pérez-Losada, Arenas, & Castro-Nallar, 2017). Sin embargo, varios estudios han demostrado que este método presenta limitaciones al momento de inferir la filogenia real de las cepas estudiadas. En un estudio de filogenia, donde se utilizó 30

secuencias de genomas completos de cepas de diez especies de bacterias como: *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, etc., se construyó árboles filogenéticos para cada especie utilizando 3 “aproximaciones”: perfiles de SNPs (*single nucleotide polymorphisms*), perfiles de secuencias concatenadas de MLST e información genómica completa de regiones comunes (Tsang, Lee, You, Lau , & Woo, 2017).

Se encontró que la información del MLST si bien permite construir un perfil con utilidad epidemiológica, ya que podemos identificar cepas patógenas e influir como se transfiere, al momento de agrupar cepas filogenéticamente fracasa en representar la evolución del genoma completo ya que contiene poca información del genoma a aproximadamente un 0,46%. Además con este tipo de estudios se ignora otros fenómenos de evolución significativos en bacterias como la transferencia horizontal de genes de resistencia. En el estudio se encontró que de todos los árboles generados, el que se desarrolló con la información del MLST presentó una topología que compartía muy poca similitud con los árboles generados con SNPs e información del genoma completo, quienes compartían una mayor similitud. Concluyéndose que los árboles filogenéticos construidos con la información de MLST son muy limitados y la información presentada debe ser tomada con precaución (Tsang et al., 2017).

En cuanto a las limitaciones de la investigación, la falta de réplicas y problemas con el secuenciamiento hicieron que los datos obtenidos sean informativos pero poco significativos y la falta de réplicas maximizó la influencia de factores de ruido sobre los resultados, aumentando la variabilidad, y limitó los potenciales análisis estadísticos.

5 CONCLUSIONES

- Controlar la propagación de bacterias multirresistentes al disminuir o reducir el uso de antibióticos es una estrategia útil sin embargo está muy limitada por eventos genéticos no controlables, que favorecen la persistencia de resistencia a ciertos agentes y que hacen que homogenizar la población a una sensible a antibióticos tome mucho tiempo.
- Las bacterias comensales poseen una alta versatilidad fenotípica que les permitirá adaptarse a cualquier ambiente nutricional, lo que hace que el cambio de dieta no los afecte.
- La tasa de recambio de la microbiota es muy alta debido a que el microbioma es un ambiente inestable y en constante cambio que somete a estrés constante a la microbiota que deberá rápidamente adaptarse presentando una enorme flexibilidad genética y fenotípica.
- La gran flexibilidad fenotípica y genotípica de *Escherichia coli* se traduce en una enorme diversidad de linajes.
- Se recomienda realizar estudios futuros, de mayor duración y de mayor alcance. En el que el diseño experimental permita comprobar que modificar el ambiente nutricional afecta la aptitud ecológica del linaje dominante y de la resistencia persistente a TET. También estudios *in vitro* que permitan verificar la flexibilidad fenotípica de *Escherichia coli* probando diferentes sustratos.

6 REFERENCIAS

- Adiri, R., Gophna, U., & Ron, E. (2003). Multilocus sequence typing (MLST) of *Escherichia coli* O78 strains. *FEMS Microbiology Letters*, 222(2), 199-203.
- Agyare, C., Etsiapa, V., Ngofi, C., & Boateng, F. (2019). Antibiotic Use in Poultry Production and Its Effects on Bacterial Resistance. En Y. Kumar, *Antimicrobial Resistance* (págs. 33-51). IntechOpen .
- Andersson, D., & Hughes, D. (2011). Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. *FEMS Microbiology Review*, 35, 901-911.
- Avila, C., & Benavides, D. (2013). *Estudio de factibilidad para la elaboración de alimentos balanceados para pollos broilers*. Quito : Universidad Central del Ecuador.
- Barrera, S., Cardenas, P., Graham, J., & Trueba, G. (2019). Changes in dominant *Escherichia coli* and antimicrobial resistance after 24 hr in fecal matter. *Microbiology Open*, 1-6.
- Bengtsson-Palme, J., & Joakim, D. (2016). Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental regulation. *Environment International*, 86, 140-149.
- Cooper, V., & Lenski, R. (2000). The population genetics of ecological specialization in evolving *Escherichia coli* populations. *Nature*, 407, 736-739.
- Cota, I., Bunk, B., Spröer, C., Overman, J., König, C., & Casadesús, J. (2016). OxyR-dependent formation of DNA methylation patterns in OpvABOFF and OpvABON cell lineages of *Salmonella enterica*. *Nucleic Acids Research*, 44(8), 3595-3609.
doi:10.1093/nar/gkv1483
- Diarra, M., Silversides, F., Diarrassouna, F., Pritchard, J., Masson, L., Brousseau, R., Bonnet, C., Delaquis, P., Bach, S., Skura, B.J., & Topp, E. (2007). Impact of Feed

- Supplementation with Antimicrobial Agents on Growth Performance of Broiler Chickens, *Clostridium perfringens* and *Enterococcus* Counts, and Antibiotic Resistance Phenotypes and Distribution of Antimicrobial Resistance Determinants in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(20), 6566-6576.
- Drummond, A., Rambaut, A., Suchard, M., & Xie, W. (3 de April de 2020). *Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees*. Obtenido de BEAST : <http://beast.bio.ed.ac.uk>
- Esparza, M. J. (22 de Noviembre de 2008). *Descripción general de los principales grupos de fármacos antimicrobianos. Antibióticos*. Obtenido de Guía-ABE. Infecciones en Pediatría. Guía rápida para la selección del tratamiento antimicrobiano empírico: <https://guia-abe.es/generalidades-descripcion-general-de-los-principales-grupos-de-farmacos-antimicrobianos-antibioticos->
- Gelder, L., Ponciano, J., Abdo, Z., Joyce, P., Forney, L., & Top, E. (2004). Combining Mathematical Models and Statistical Methods to Understand and Predict the Dynamics of Antibiotic-Sensitive Mutants in a Population of Resistant Bacteria During Experimental Evolution. *Genetics Society of America*, 168, 1131-1144.
- Gibert, M. (2010). *Colibacilosis en avicultura: Situación actual*. Obtenido de Asociación Española de Ciencia Avícola : www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs.../colibacilosis_en_avicultura_-_magdalena_gibert.pdf
- Ginnobili, S. (2013). Fitness ecológico. *Contrastes-Revista Internacional de Filosofía*(18), 84-97.
- Gordon, C. J. (2008). Thermoregulation in homeothermic and poikilothermic organisms. *Hypothermia-From Threat to Cure*. Manhattan: NY Academy of Sciences.

- Hamid, A., Mehmood, N., Javaid , M., Iqbal, A., Ilyas, M., & Tahir, R. (2014). Estimation of Protein, Carbohydrate, Starch and Oil Contents of Indigenous Maize (*Zea mays* L.) Germplasm. *European Academic Research*, 2(4), 5230-5240.
- Hou, A., Chen, P., Shi , A., Zhang, B., & Wang , Y. (2008). Sugar Variation in Soybean Seed Assessed with a Rapid Extraction and Quantification Method. *International Journal of Agronomy*, 2009. doi:10.1155/2009/484571
- Jolliffe, I., & Cadima, J. (2016). Principal component analysis: a review and recent developments. *Philosophical Transactions A*, A374. doi:20150202
- Karami, N., Nowrouzian, F., Adlerberth, I., & Wold, A. (2006). Tetracycline Resistance in *Escherichia coli* and Persistence in the Infantile Colonic Microbiota. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 50(1), 156-161. doi:10.1128/AAC.50.1.156–161.2006
- Khan , S., Beattie, T., & Knapp, C. (2017). The use of minimum selectable concentrations (MSCs) for determining the selection of antimicrobial resistant bacteria. *Ecotoxicology*, 26(2), 283-292. doi:10.1007/s10646-017-1762-y
- Kumar, S., Stecher, G., Li , M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547-1549.
- Lee, C. (2015). The Antibiotic Resistance Crisis- Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4), 277-283.
- Leisner, J., Jørgensen, N., & Middelboe, M. (2016). Predation and selection for antibiotic resistance in natural environments. *Evolutionary Applications*, 9(3), 427-434.
- Madigan, M., Martinko , J. M., Bender, K., Buckley , D., & Stahl, D. (2015). *Brock. Biología de los Microorganismos* (Catorceava ed.). Pearson.

- Mehdi, Y., Létourneau, M., Gaucher, M., Chorfi, Y., Suresh, G., Rouissi, T., Kaur, S., Côté, C., Avalos, A., & Godbout, S. (2018). Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. *Animal Nutrition*, 4, 170-178.
- Melnyk, A., McCloskey, N., Hinz, A., Dettman, J., & Kassen, R. (2017). Evolution of Cost-Free Resistance under Fluctuating Drug Selection in *Pseudomonas aeruginosa*. *Ecological and Evolutionary Science*, 2(4). doi:10.1128/mSphere.00158-17
- Melnyk, A., Wong, A., & Kassen, R. (2014). The fitness costs of antibiotic resistance mutations. *Evolutionary Applications*, 7, 273-283.
- Miller, S. (2016). Antibiotic Resistance and Regulation of the Gram-Negative Bacterial Outer Membrane Barrier by Host Innate Immune Molecules. *mBio*, 7(5), 1-3.
- Monk, J., Charusanti, P., Aziz, R., Lerman, J., Premyodhin, N., Orth, J., Feist, A., & Palsson, B. (2013). Genome-scale metabolic reconstructions of multiple *Escherichia coli* strains highlight strain-specific adaptations to nutritional environments. *PNAS*, 110(50), 20338-20343.
- Morgan, H., Acuff, G., Bergeron, G., Bourassa, M., Gill, J., Graham, D., Kahn, L., Morley, P., Salois, M., Simjee, S., Singer, R., Smith, T., Storrs, C., & Wittum, T. (2019). Critically important antibiotics: criteria and approaches for. *ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES*, 1441, 8-16.
- Papke, R. T., & Gogarten, J. P. (2012). How Bacterial Lineages Emerge. *Science*, 336(6077), 45-46. doi:10.1126/science.1219241
- Parsonage, B., Hagglund, P., Keogh, L., Wheelhouse, N., Brown, R., & Dancer, S. (2017). Control of Antimicrobial Resistance Requires an Ethical Approach. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1-14.
- Pavón, A., & Maiden, M. (2014). Multilocus Sequence Typing. *Methods of Molecular Biology*, 1-11.

- Pérez-Losada, M., Arenas, M., & Castro-Nallar, E. (2017). Multilocus Sequence Typing of Pathogens: Methods, Analyses, and Applications. En M. Tibayrenc, *Genetics and Evolution of Infectious Diseases* (págs. 383-404). Elsevier. doi:10.1016/b978-0-12-799942-5.00016-0
- Porse , A., Gumpert, H., Kubicek-Sutherland, J., Karami, N., Adlerberth, I., Wold , A., Andersson, D., Sommer , M. (2017). Genome Dynamics of Escherichia coli during Antibiotic Treatment: Transfer, Loss, and Persistence of Genetic Elements In situ of the Infant Gut. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(126), 1-7. doi:2017.00126
- Sane, M., Miranda, J. J., & Agashe, D. (2018). Antagonistic pleiotropy for carbon use is rare in new mutations. *Evolution*, 72(10), 2202-2213.
- Schulz , P., Engelstädter, J., & Bonhoeffer, S. (2010). Compensation of Fitness Costs and Reversibility of Antibiotic Resistance Mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(5), 2085-2095. doi:10.1128/AAC.01460-09
- Seni, O. (2015). Detección de cepas de Escherichia coli Shiga Toxigénica (STEC) y enteropatógena (EPEC) basada en PCR multiplex. *La técnica*, 78-89. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/6087673.pdf>.
- Tsang, A., Lee, H., You, S., Lau , S., & Woo, P. (2017). Failure of phylogeny inferred from multilocus sequence typing to represent bacterial phylogeny. *Scientific Reports*, 7(4536). doi:10.1038/s41598-017-04707-4
- Valverde , T., Meave , J., Carabias, J., & Cano-Santana, Z. (2005). *Ecología y medio ambiente* (Primera ed.). México: Pearson Education.
- Wedig , C., Jaster, E., & Moore, K. (1986). Composition and Digestibility of Alfalfa and Orchardgrass Hemicellulose Monosaccharides by Holstein Steers. *Journal of Dairy Science*, 69(5), 1309-1316.

White, P., Mcleever, C., & Rawlinson, W. (2001). Integrons and Gene Cassettes in the Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(8), 2658-2661.
doi: 10.1128/AAC.45.9.2658-2661.2001

Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L., Karch, H., Reeves, P., Maiden, M., Ochman, H., & Achtman, M. (2006). Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Molecular Microbiology*, 60(5), 1136-1151.

ANEXO A: RESULTADOS

		a.		b.			
		Muestreo 2		valor p	Muestreo 2		valor p
		Dieta A	Dieta B		Sitio 1	Sitio 2	
CF	Sensibilidad	99	97	0,3124	97	99	0,3124
	Resistencia	1	3		3	1	
CIP	Sensibilidad	76	67	0,1586	70	73	0,6384
	Resistencia	24	33		30	27	
AMP	Sensibilidad	68	61	0,3009	65	64	0,8825
	Resistencia	32	39		35	36	
C	Sensibilidad	76	75	0,8694	76	75	0,8694
	Resistencia	24	25		24	25	
IMP	Sensibilidad	100	99	0,3161	99	100	0,3161
	Resistencia	0	1		1	0	
SXT	Sensibilidad	51	54	0,6710	59	46	0,0657
	Resistencia	49	46		41	54	
GN	Sensibilidad	100	100	-	100	100	-
	Resistencia	0	0		0	0	
CAZ	Sensibilidad	100	100	-	100	100	-
	Resistencia	0	0		0	0	
FEP	Sensibilidad	100	97	0,0810	97	100	0,0810
	Resistencia	0	3		3	0	
CTX	Sensibilidad	99	96	0,1742	96	99	0,1742
	Resistencia	1	4		4	1	

TET	Sensibilidad	24	21	0,6115	31	14	0,004
	Resistencia	76	79		69	86	
AMC	Sensibilidad	93	96	0,3521	90	99	0,005
	Resistencia	7	4		10	1	

Tabla 1. Análisis de X^2 : La tabla registra los análisis de X^2 para el número de bacterias sensibles y resistentes para todos los antibióticos, considerando los factores dieta (a) y ambiente (b). En a, no se observa diferencias estadísticamente significativa entre los individuos sensibles y resistentes para ningún antibióticos al comparar la dieta A con la B; considerando que $p \geq \alpha$ (0,05). En b, solo los antibióticos: TET y AMC; presentan una diferencia estadísticamente significativa al comparar los individuos sensibles y resistentes del sitio 1 con los del sitio 2; considerando que $p \leq \alpha$ (0,05).

	a.			b.			c.		
	Ambiente			Dieta			Tiempo		
	Muestreo 2			Muestreo 2			Sitio 1		
Fenotipos	Dieta A	Dieta B	P-value	Sitio 1	Sitio 2	P-value	3 seman	6 seman	P-value
únicos	6	8	0,676	6	8	0,676	48	6	0,0002
compartidos	11	11		11	11		11	11	

Tabla 2. Análisis de X^2 -diversidad de fenotipos: La tabla registra los análisis de X^2 para el número de fenotipos únicos y compartidos, considerando los factores dieta (a), ambiente (b), tiempo (c). En a, no se observa una diferencia estadísticamente significativa entre los fenotipos únicos y compartidos, al comparar el sitio 1 con el 2 en el muestreo 2, considerando que $p \geq \alpha$ (0,05). En b, tampoco se observa una diferencia estadísticamente significativa, al comparar la dieta A con la B en el muestreo 2, considerando que $p \geq \alpha$ (0,05). En c, si se observa una

diferencia estadísticamente significativa, al comparar las 3 semanas (muestreo 1) con las seis semanas (muestreo 2) en el mismo sitio.

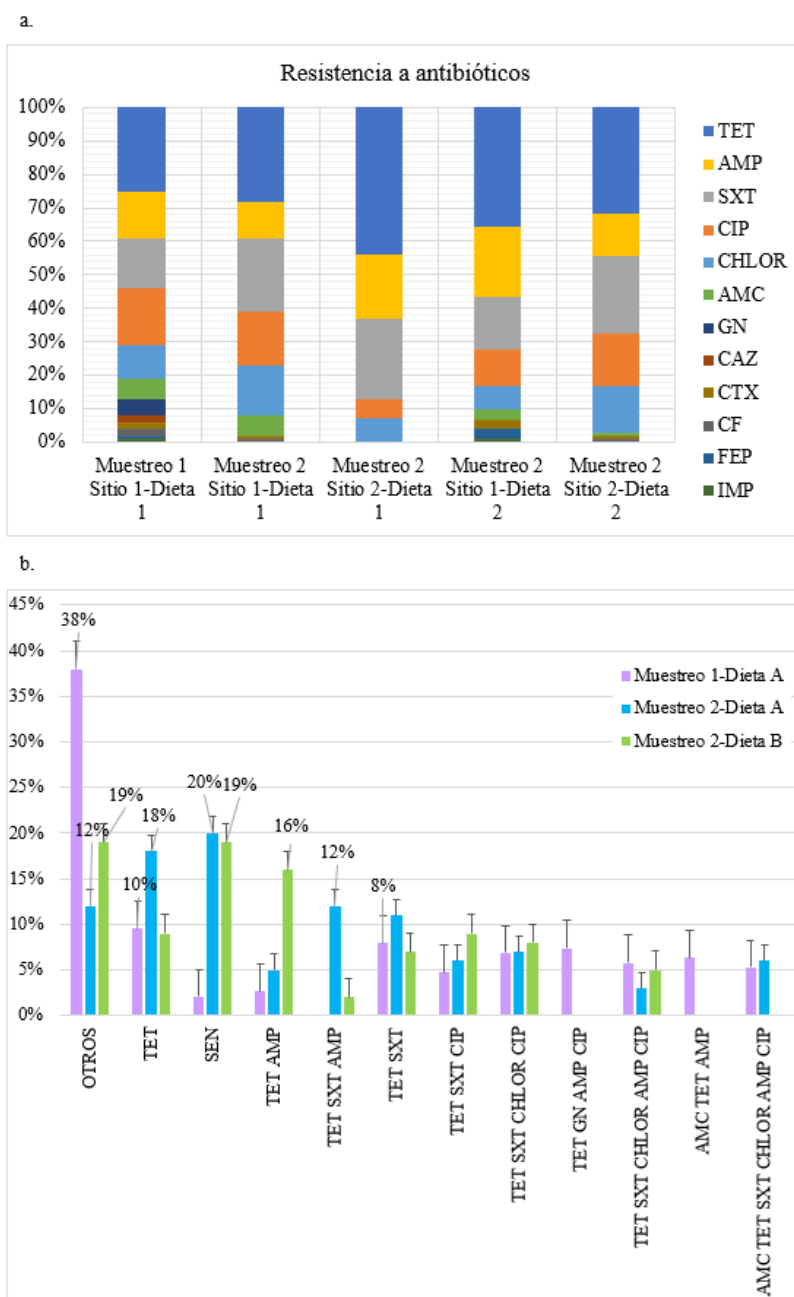


Figura 1. Porcentaje de individuos por cada fenotipo de resistencia a antibióticos: a.

Resistencias a antibióticos presentes en todas las poblaciones estudiadas, las resistencias comunes a todas las poblaciones son: TET (azul), AMP (amarillo), SXT (gris), CIP (naranja), CHLOR (celeste). b. Perfiles de resistencias más comunes. En el muestreo 1-dieta A (morado) se analizaron 189 muestras, la resistencia a TET fue la más frecuente junto con TET SXT. En

el muestreo 2-dieta A (celeste) se analizaron 100 muestras, el fenotipo más frecuente fue SEN, sensibilidad a todos los antibióticos, y la resistencia a TET. Mientras que en el muestreo 2-dieta B (verde) se analizan 100 muestras, el fenotipo más frecuente fue SEN y la resistencia a TET AMP.

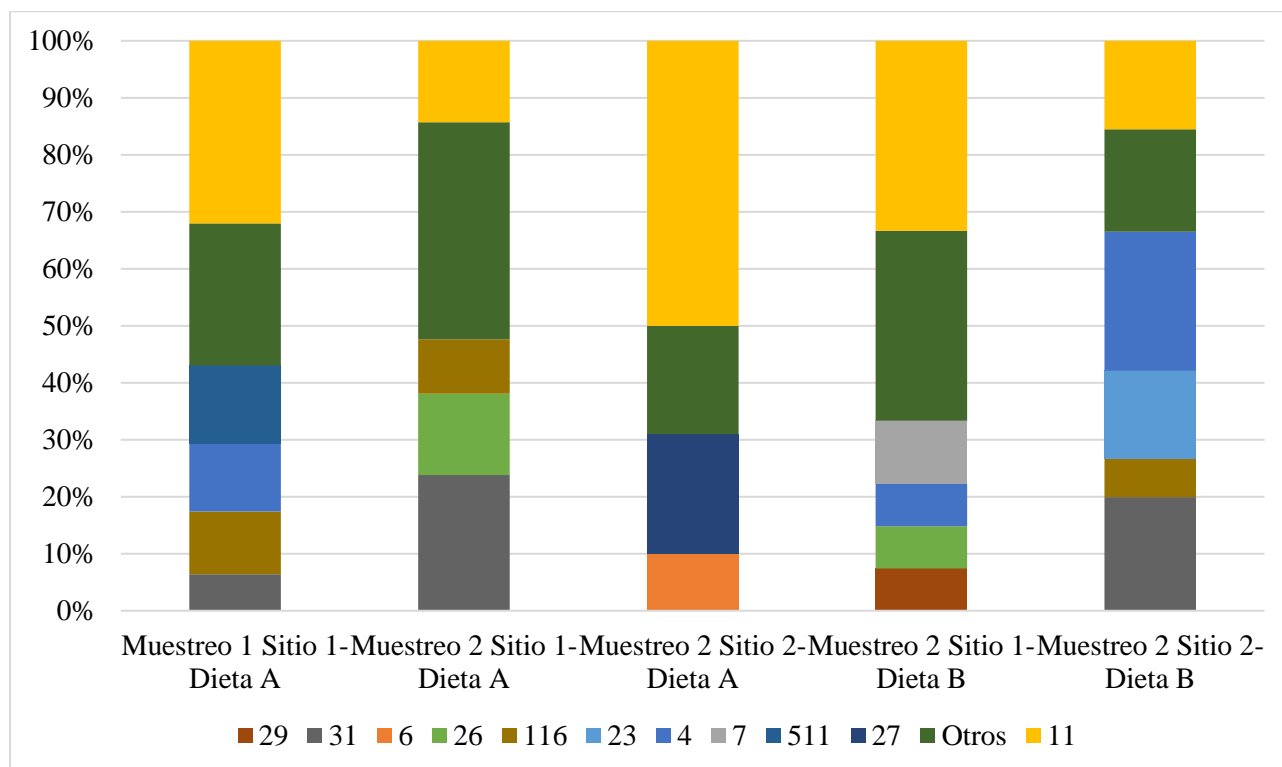


Figura 2. Proporciones de alelos *fum C* en las poblaciones estudiadas: El alelo 11 (amarillo) al estar presente en todos los grupos se lo considera el alelo dominante. Por otra parte, los alelos que están presentes en una proporción menor al 5% forman parte de la categoría: otros.

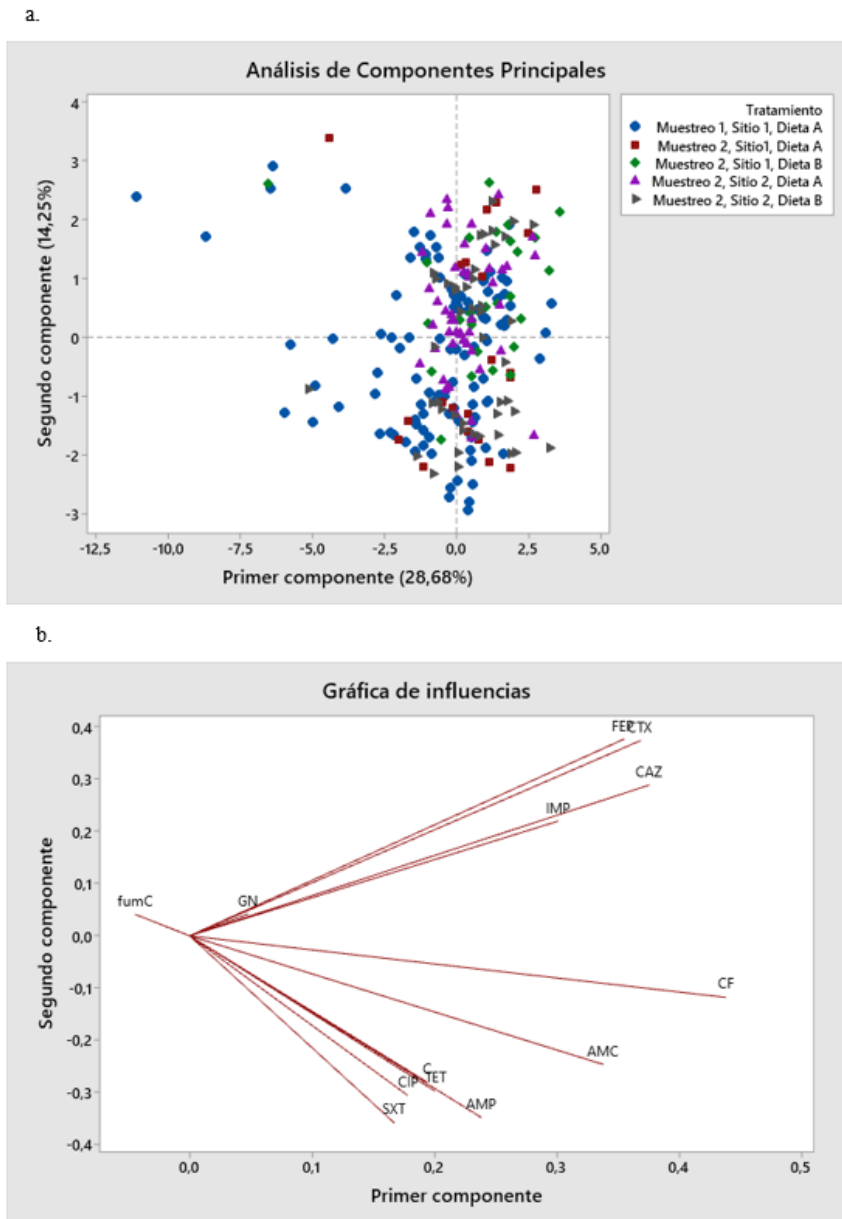


Figura 3. Análisis de Componentes Principales: a. Se observa el análisis de componentes principales, no se aprecia agrupamiento de los datos considerando el factor ambiente; tampoco al considerar el factor dieta. Todos los puntos están sobrepuestos. Los 2 componentes principales explican el 42,93% de la variabilidad. Para construir el gráfico se utilizó la longitud de los halos para los antibióticos del antibiograma: CF, CIP, AMP, C, IMP, SXT, GN, CAZ, FEP, CTX, TET, AMC; y los alelos del gen *fum C*. b. El gráfico de influencias indica que la variable *fum C* al estar próxima a cero no influirá sobre los componentes principales, por lo que puede ser descartada. Mientras que las variables: CF, AMC, CF, TET, AMP, CIP y SXT

al ser menores a cero influyen de forma negativa a los componentes principales. Lo opuesto pasa con las variables: GN, IMP, CAZ, FEP y CTX; que al ser mayores a cero influyen positivamente en los componentes principales.

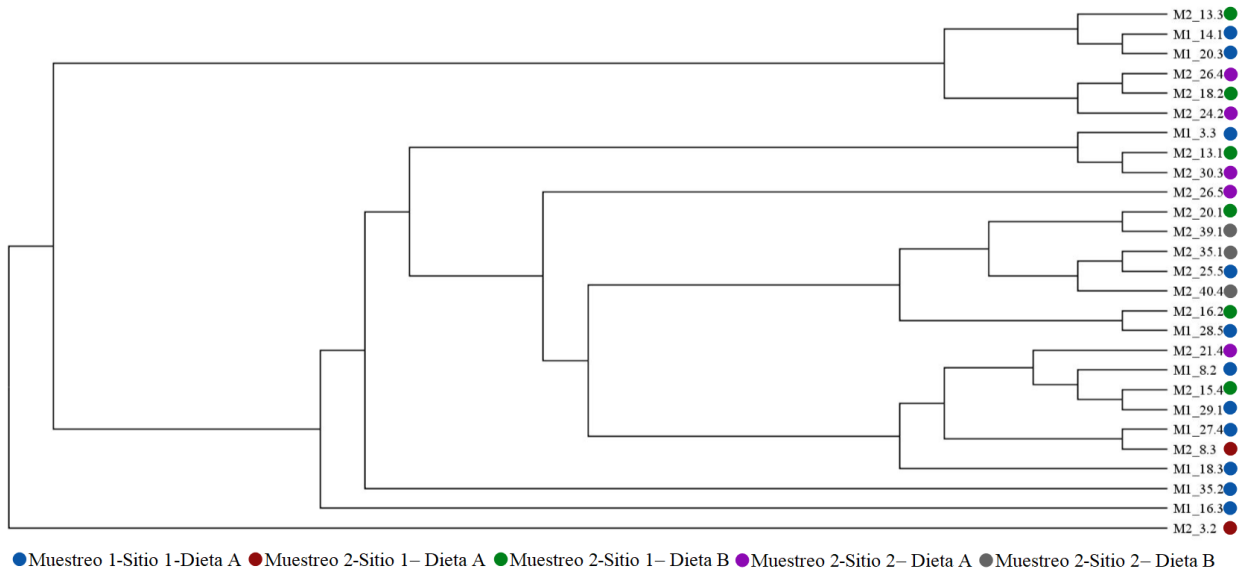


Figura 4. Cladograma secuencias de MLST: Para realizar el cladograma se tomó las secuencias de los siete *housekeeping genes* y se las alineó formando un constructo. Para generarlo se utilizó métodos bayesianos y los software *BEAUti*, *Beast* y *Tree Annotator*. Se utilizó un *Burn-in* del 20% y el algoritmo *Maximum Clade Credibility Tree*.

ANEXO B: METODOLOGÍA PARA MLST

fum C

Longitud del fragmento: 469 bp

- *Primer Forward*: TCACAGGTCGCCAGCGCTTC
- *Primer Reverse*: GTACGCAGCGAAAAAGATTC

PROGRAMA DE PCR:

Denaturación inicial: Temperatura 95°C, tiempo 3 min y 1 ciclo

Denaturación: Temperatura 94°C, tiempo 0,5 min y 30 ciclos

Hibridación: Temperatura 55°C, tiempo 0,5 min y 30 ciclos

Extensión: Temperatura 72°C, tiempo 1 min y 30 ciclos

Extensión final: Temperatura 72°C, tiempo 7 min y 1 ciclo

Fuente: (Wirth, et al., 2006)

adk

Longitud del fragmento: 536 bp

- *Primer Forward*: CGGGCGCGGGGAAAGGGACTC
- *Primer Reverse*: GCGCGAACTTCAGCAACCG

PROGRAMA DE PCR:

Denaturación inicial: Temperatura 95°C, tiempo 5min y 1 ciclo

Denaturación: Temperatura 94°C, tiempo 0,4 min y 30 ciclos

Hibridación: Temperatura 59°C, tiempo 0,45 min y 30 ciclos

Extensión: Temperatura 72°C, tiempo 0,45 min y 30 ciclos

Extensión final: Temperatura 72°C, tiempo 5 min y 1 ciclo

Fuente: (Adiri, Gophna, & Ron , 2003).

mdh

Longitud del fragmento: 452 bp

- *Primer Forward*: CCCGGTGTGGCTGTCGATCTGA
- *Primer Reverse*: CGCCGTTTTTACCCAGCAGCAGC

PROGRAMA DE PCR:

Denaturación inicial: Temperatura 95°C, tiempo 5 min y 1 ciclo

Denaturación: Temperatura 94°C, tiempo 0,4 min y 30 ciclos

Hibridación: Temperatura 59°C, tiempo 0,45 min y 30 ciclos

Extensión: Temperatura 72°C, tiempo 0,45 min y 30 ciclos

Extensión final: Temperatura 72°C, tiempo 5 min y 1 ciclo

Fuente: (Adiri, Gophna, & Ron , 2003).

pur A

Longitud del fragmento: 478 bp

- *Primer Forward*: TCGGTAACGGTGTGTGCTG
- *Primer Reverse*: CATACGGTAAGCCACGCAGA

PROGRAMA DE PCR:

Denaturación inicial: Temperatura 95°C, tiempo 2 min y 1 ciclo

Denaturación: Temperatura 95°C, tiempo 1 min y 30 ciclos

Hibridación: Temperatura 54°C, tiempo 1 min y 30 ciclos

Extensión: Temperatura 72°C, tiempo 2 min y 30 ciclos

Extensión final: Temperatura 72°C, tiempo 5 min y 1 ciclo

Fuente: (Wirth et al., 2006).

rec A

Longitud del fragmento: 510 bp

- *Primer Forward:* ACCTTTGTAGCTGTACCACG
- *Primer Reverse:* TCGTCGAAATCTACGGACCGGA

PROGRAMA DE PCR:

Denaturación inicial: Temperatura 95°C, tiempo 2 min y 1 ciclo

Denaturación: Temperatura 95°C, tiempo 1 min y 30 ciclos

Hibridación: Temperatura 58°C, tiempo 1 min y 30 ciclos

Extensión: Temperatura 72°C, tiempo 2 min y 30 ciclos

Extensión final: Temperatura 72°C, tiempo 5 min y 1 ciclo

Fuente: (Wirth et al., 2006).

gyr B

Longitud del fragmento: 460 bp

- *Primer Forward:* TCGGCGACACGGATGACGGC
- *Primer Reverse:* GTCCATGTAGGCGTTCAGGG

PROGRAMA DE PCR:

Denaturación inicial: Temperatura 95°C, tiempo 2 min y 1 ciclo

Denaturación: Temperatura 95°C, tiempo 1 min y 30 ciclos

Hibridación: Temperatura 60°C, tiempo 1 min y 30 ciclos

Extensión: Temperatura 72°C, tiempo 2 min y 30 ciclos

Extensión final: Temperatura 72°C, tiempo 5 min y 1 ciclo

Fuente: (Wirth et al., 2006).

icd

Longitud del fragmento: 518 bp

- *Primer Forward*: ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA
- *Primer Reverse*: GGACGCAGCAGGATCTGTT

PROGRAMA DE PCR:

Denaturación inicial: Temperatura 95°C, tiempo 2 min y 1 ciclo

Denaturación: Temperatura 95°C, tiempo 1 min y 30 ciclos

Hibridación: Temperatura 54°C, tiempo 1 min y 30 ciclos

Extensión: Temperatura 72°C, tiempo 2 min y 30 ciclos

Extensión final: Temperatura 72°C, tiempo 5 min y 1 ciclo

Fuente: (Wirth et al., 2006).

ANEXO C: REACTIVOS PCR

Cada tubo para la reacción de PCR contenía los siguientes reactivos:

- 12,5 μL de GoTaq® Green Master Mix
- 0,15 μL de primer forward y reverse
- 2 μL del ADN template
- 10,2 μL de agua de PCR

Para completar un volumen total de 25 μL

ANEXO D: AUTORIZACIÓN COMITÉ DE BIOÉTICA USFQ

Quito, 17 de mayo de 2019

OFICIO: 2019-006

Daniela García, estudiante de Ingeniería en Procesos Biotecnológicos
Profa. María Fernanda Loayza. Instituto de Microbiología
Prof. Gabriel Trueba. Director del Programa de Doctorado del Instituto de Microbiología
USFQ –
- Presente.-

Estimados investigadores:

Por medio de la presente, tengo a bien informarle que se ha procedido a la evaluación de su proyecto de investigación titulado **“Influencia de la dieta y el ambiente en la evolución de linajes de *Escherichia coli* comensal de pollos de engorde.”**, y después de evaluar el caso en relación con el cumplimiento de las Normas de Bienestar Animal y de las recomendaciones de Reemplazo, Reducción y Refinamiento en la investigación con animales, propuestas por Russell y Burch (1959), se ha decidido **APROBAR** el mencionado proyecto.

Así mismo, se le informa que **este aval cubre únicamente los aspectos relacionados con el respeto a los principios y normativas vigentes acerca del bienestar animal en la investigación y docencia, tal como se redactaron en el protocolo aprobado**. Si usted incumple o cambia sin previo aviso cualquier aspecto de su diseño experimental de manera que afecte las Normas y Recomendaciones arriba mencionadas, el aval se considerará nulo. Otros cambios en el diseño metodológico no anulan este aval por no corresponder a las competencias de este comité.

Sin otro particular al cual hacer referencia, y deseándole todo el éxito posible, me despido,

Atentamente,


Firma el 17/05/2019

Francisco Cabrera
Presidente

Comité de Ética en el Uso de Animales en Investigación y Docencia de la USFQ