

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Resistencia a colistina en enterobacterias productoras de  
betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas  
aisladas de animales de granja de la provincia de Imbabura**

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias  
Biológicas**

**WILSON PAUL VARGAS CALO**

**Quito, 2023**

## **CERTIFICACIÓN**

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del Sr. Wilson Paul Vargas Calo ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente

Dra. Iliana Alcocer Negrete  
Directora de la disertación  
Quito, 15 de abril del 2023

## DEDICATORIA

Con mucho cariño,

A mis abuelos Miguel y María quienes han sido mi motor motivacional para continuar trabajando con esmero, por ser un ejemplo de lucha, perseverancia y entrega. Por todos los valores y el amor que han inculcado en mi para ser la persona que soy.

A mi madre Marina por su apoyo incondicional durante toda mi vida, especialmente durante mi etapa universitaria.

A mi ser de luz encarnado en un animalito de cuatro patas que supo llegar en el momento adecuado tras una larga pandemia, **“LUPE”**.

## AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo agradecimiento a cada uno de mis familiares quienes fueron parte de todo mi proceso formativo universitario, a todos quienes a pesar de la distancia buscaron la forma de transmitirme su apoyo incondicional.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, a sus destacados docentes e investigadores quienes compartieron sus conocimientos teóricos y prácticos para el constante desarrollo de mi perfil profesional. Al Laboratorio de Microbiología de la escuela de Ciencias Biológicas por la facilitación de todos los equipos de laboratorio y por la financiación del material utilizado para el desarrollo de mi investigación. Mención especial al programa “Mi primer empleo PUCE” del cual pude ser parte en tres ocasiones, dos de ellas en el programa “Manejo de la Colección Bacteriana Quito Católica” dirigido por la Dra. Iliana Alcocer quien además de ser mi directora, docente y mentora, ha sido ejemplo y figura de dedicación, constancia, trabajo, amor y pasión por la investigación, la docencia y la Microbiología. Así también, un profundo agradecimiento a la M. Sc. Fernanda Yauri por haber compartido conmigo cada uno de sus conocimientos con paciencia voluntad y cariño, por su valioso tiempo y por siempre transmitir su entusiasmo a la hora de hacer investigación. Agradecimiento especial a Patricia Portero quien además de ser mi lectora y docente en el campo de la bioquímica, también fue la persona que estuvo a cargo de mi acompañamiento integral.

Gracias a mis compañeros de laboratorio y amigos; Isaac, Christian, Stephany y Jerram quienes contribuyeron en el desarrollo de mi trabajo investigativo y quienes han sido parte de gratos momentos. A Estibaliz y Daniela, personas con quienes más compartí a lo largo de la carrera entre anécdotas, risas, alegrías y llantos. Infinitas gracias a Jeimmy Lara por la paciencia, su compañía y por inyectar esa dulzura, amor y pasión hacia las cosas que realizo día a día.

Finalmente, gracias a Christian, mi primo, quien más allá del vínculo familiar ha sido un fiel amigo que siempre ha buscado la forma de apoyarme además de motivarme a reflexionar sobre una infinidad de acontecimientos que ocurren a mi alrededor.

## TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1 OBJETIVOS.....	8
3.1.1 OBJETIVO GENERAL .....	8
3.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	8
4. METODOLOGÍA.....	9
4.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO Y REIDENTIFICACIÓN DE AISLADOS BACTERIANOS.....	9
4.2. CONFIRMACIÓN FENOTÍPICA DE PRODUCCIÓN DE $\beta$ -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE), CARBAPENEMASAS Y RESISTENCIA ANTIBIÓTICA .....	10
4.3. PRUEBA DE SENSIBILIDAD A COLISTINA MEDIANTE ELUCIÓN EN CALDO .....	12
4.4. DETECCIÓN MOLECULAR DE GENES IMPLICADOS EN LA RESISTENCIA A BETALACTAMASAS Y A COLISTINA.....	13
4.5. DETERMINACIÓN DE SECUENCIAS TIPO (ST) MEDIANTE TIPIFICACIÓN DE SECUENCIAS MULTILOCUS (MLST) .....	16
5. RESULTADOS .....	18
5.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO Y REIDENTIFICACIÓN DE AISLADOS BACTERIANOS.....	18
5.2 DETECCIÓN FENOTÍPICA DE PRODUCCIÓN DE BELACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE), CARBAPENEMASAS Y RESISTENCIA ANTIBIÓTICA .....	20
5.3 DETECCIÓN FENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA A COLISTINA.....	25
5.4 DETECCIÓN MOLECULAR DE PRESENCIA DE GENES IMPLICADOS EN LA RESISTENCIA A BETALACTAMASAS Y COLISTINA.....	27

5.5 TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS POR SECUENCIAS MULTILOCUS (MLST).....	31
6. DISCUSIÓN.....	33
7. CONCLUSIONES .....	41
8. LITERATURA CITADA .....	43
9. ANEXOS.....	57

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ilustración gráfica del método de elución de disco en medio CAMBH..	12
<b>Figura 2</b> Resultados de pruebas bioquímicas aplicadas para la confirmación de género y especies de los aislados.....	18
<b>Figura 3</b> Imagen referencial sobre la metodología aplicada para evaluar la resistencia a antibióticos.....	20
<b>Figura 4</b> Determinación fenotípica de la producción de BLEE.....	22
<b>Figura 5</b> Perfiles de resistencia antibiótica totales por cada aislado.....	24
<b>Figura 6</b> Perfiles de resistencia por antibiótico .....	24
<b>Figura 7</b> Imágenes referenciales sobre la prueba de sensibilidad a colistina por elución en medio CAMBH.....	26
<b>Figura 8.</b> Gel de agarosa representativo para genes BLEE y <i>mcr</i> con productos amplificados mediante PCR. ....	28
<b>Figura 9.</b> Gel representativo de la detección de genes <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> de los aislados obtenidos de granjas de la provincia de Imbabura. ....	30
<b>Figura 10.</b> Gel representativo de la detección de genes <i>mcr-1</i> de los aislados...	31

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación, modo de acción, abreviatura, concentración y puntos de corte de los antibióticos utilizados en las evaluaciones fenotípicas.....	11
<b>Tabla 2.</b> Lista de cebadores utilizados en la amplificación y detección de genes.	14
<b>Tabla 3.</b> Programación de termociclador para la amplificación de genes. ....	15
<b>Tabla 4.</b> Datos de origen, fecha de aislamiento, identificación bioquímica e identificación MALDI-TOF de los aislados estudiados.....	19
<b>Tabla 5.</b> Valores de la sensibilidad antimicrobiana e interpretación de los 30 aislados analizados en el estudio. ....	21
<b>Tabla 6.</b> Confirmación fenotípica de la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) para los 30 aislados estudiados. ....	23
<b>Tabla 7.</b> Aislados que presentan resistencia fenotípica simultánea y presencia de genes.....	25
<b>Tabla 8</b> Resultados de la prueba de elusión en disco CAMBH.....	27
<b>Tabla 9.</b> Resumen de detección de genes amplificados.....	29
<b>Tabla 10.</b> Perfiles alélicos obtenidos para los genes conservados “housekeeping” de <i>Escherichia coli</i> y la ST asignada mediante MLST.....	32

## ANEXOS

<b>Anexo 1</b> Puntos de recolección de muestras ubicados mediante datos de coordenadas geográficas en la provincia de Imbabura. ....	57
<b>Anexo 2</b> Conformación estructural adaptado para colistina. ....	58
<b>Anexo 3</b> Representación esquemática sobre el mecanismo metabólico de la resistencia a la colistina mediada por MCR-2 en relación con la modificación del lipopolisacárido. ....	59
<b>Anexo 4</b> Genes reguladores implicados en la regulación del lipopolisacáridos relacionados con la resistencia a la polimixinas en enterobacterias.....	60
<b>Anexo 5</b> Resumen general de los resultados obtenidos en el estudio. ....	61

## 1. RESUMEN

La resistencia antimicrobiana representa una amenaza mundial para la salud debido a la relación intrínseca que existe entre las bacterias, el ser humano, los animales y el medio ambiente. Antibióticos como los betalactámicos y las polimixinas desempeñan un papel fundamental en el tratamiento de infecciones multirresistentes, su uso constante e inadecuado induce una presión selectiva acelerada en los microorganismos permitiendo el desarrollo, adquisición y adaptación de varios mecanismos de resistencia que están mediados por la combinación de mutaciones cromosómicas y por transferencia horizontal de genes. La amplitud de estos mecanismos ha generado un nuevo dilema terapéutico relacionando el control y el manejo de las infecciones con la disponibilidad de antibióticos y metodologías utilizadas para la evaluación de la resistencia a múltiples fármacos. El objetivo de este estudio fue caracterizar de manera fenotípica y genotípica la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas en aislados resistentes a colistina obtenidos a partir de animales de granjas de la provincia de Imbabura que forman parte de la Colección Bacteriana - Quito Católica (CB-QCA). Se seleccionaron treinta aislados de los cuales 18 correspondían a *Proteus mirabilis*, 11 fueron identificados como *Escherichia coli* y un aislado correspondía a *Enterococcus faecalis*. Fenotípicamente 14/30 (46,7%) aislados fueron productores de BLEE, 15/30 (50%) presentan perfiles de resistencia a carbapenémicos y 21/30 (70%) son resistentes a colistina. Se encontró que, 14/30 (46,7%) de los aislados son resistentes a tres o más familias de antibióticos. A nivel genotípico se detectaron genes de tipo *bla*<sub>CTX-M</sub> en 14/30 (46,7%) de los aislados, *bla*<sub>TEM</sub> en 10/30 (33,3 %), *bla*<sub>SHV</sub> en 8/30 (26,7%) y no se amplificaron los alelos de los genes *mcr*. Mediante Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST) en *Escherichia coli* se encontraron 6 secuencias tipo (ST): ST90, ST101, ST624, ST1589, ST3596, ST3856 y 4 ST más aún sin reportar. Los resultados obtenidos confirman la prevalencia de aislados multirresistentes a nivel fenotípico además de la presencia de genes que confieren resistencia a antibióticos.

Palabras clave: BLEE, carbapenemasas, colistina, *mcr*, resistencia antimicrobiana.

## 2. ABSTRACT

Antimicrobial resistance poses a global health threat due to the intrinsic relationship between bacteria, humans, animals, and the environment. Antibiotics such as beta-lactams and polymyxins play a fundamental role in the treatment of multidrug-resistant infections, their constant and inappropriate use induces an accelerated selective pressure in microorganisms allowing the development, acquisition and adaptation of several resistance mechanisms that are mediated by the combination of chromosomal mutations and horizontal gene transfer. The breadth of these mechanisms has generated a new therapeutic dilemma relating the control and management of infections with the availability of antibiotics and methodologies used for the evaluation of resistance to multiple drugs. The objective of this study was to characterize in a phenotypic and genotypic way the production of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) and carbapenemases in colistin-resistant isolates obtained from farm animals in the province of Imbabura that are part of the Colección Bacteriana - Quito Católica (CB-QCA). Thirty isolates were selected, of which 18 corresponded to *Proteus mirabilis*, 11 were identified as *Escherichia coli* and one isolate corresponded to *Enterococcus faecalis*. Phenotypically 14/30 (46.7%) of isolates were ESBL-producing, 12/30 (40%) have resistance profiles to carbapenems and 21/30 (70%) are resistant to colistin. It was found that 14/30 (46.7%) of isolates are resistant to three or more families of antibiotics. At the genotypic level, *bla*<sub>CTX-M</sub> genes were detected in 46.7 % (14/30) of the isolates, *bla*<sub>TEM</sub> in 10/30 (33.3 %), *bla*<sub>SHV</sub> in 8/30 (26.7%) and the alleles of the *mcr* genes were not amplified. By means of Multilocus Sequence Typing (MLST) in *E. coli*, 6 sequences type (ST) were found: ST90, ST101, ST624, ST1589, ST3596, ST3856 and 4 STs without reporting. The results confirm the prevalence of multidrug-resistant isolates at the phenotypic level in addition to the presence of genes that confer resistance to antibiotics.

Keywords: ESBL, carbapenemases, colistin, *mcr*, antimicrobial resistance.

### 3. INTRODUCCIÓN

Durante la última década las enterobacterias se han convertido en un problema de salud pública a nivel mundial debido a su alto nivel de resistencia a los antibióticos, a su rápida propagación en el ambiente y a su alta capacidad de provocar infecciones invasivas que comprometen la salud de las comunidades y hospitales en todo el mundo (Otter et al., 2017). Según un informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2022), se reportaron altos niveles de resistencia en bacterias causantes de infecciones ampliamente mortales en alrededor de 87 países en 2020, en donde bacterias como *Escherichia coli* indicaron niveles de resistencia por encima del 20% a antibióticos de primera y segunda línea. Además, se destacó un aumento del 15% en cepas resistentes comparando los niveles de resistencia existentes en el año 2017.

La tasa de mortalidad asociada a la resistencia antimicrobiana (RAM) supera las 700 mil muertes anuales, en efecto, en 2019 se reportaron alrededor de 1,7 millones de muertes asociadas a patógenos resistentes a antibióticos y se estima que para el año 2050 la tasa de mortalidad anual alcance los 10 millones de muertes por año. (Murray et al., 2022; OPS y OMS 2021; O'Neill, 2016).

La RAM pasó a ser una de las principales amenazas mundiales debido a factores como la indebida prescripción médica y el uso indiscriminado de antibióticos, entre ellos los carbapenémicos que son utilizados a menudo en producción ganadera y en el tratamiento de infecciones en seres humanos (OPS y OMS, 2022). El suministro de antibióticos para estos fines ha promovido y acelerado el aumento de bacterias resistentes y multirresistentes, dejando como resultado una menor disponibilidad de antibióticos efectivos capaces de combatir la resistencia adquirida por microorganismos (El-Sayed Ahmed et al., 2020).

La OMS ha clasificado a las enterobacterias resistentes a carbapenémicos como patógenos críticos de prioridad uno (OMS, 2017). Los carbapenémicos pertenecen a una clase de antibióticos betalactámicos de amplio espectro, actividad y resistencia al ataque de enzimas tipo betalactamasas. Son altamente potentes contra bacterias Gram-negativas (Katip, Yoodee, Uitrakul y Oberdorfer, 2021; Rodríguez-

Baño, Gutiérrez-Gutiérrez, Machuca y Pascual, 2018). Algunas especies de la familia Enterobacteriaceae, como *E. coli*, son capaces de producir enzimas que simplifican la actividad de los carbapenémicos (Aklilu, Harun, y Singh, 2022; Loest et al., 2022). Entre los mecanismos de resistencia desarrollados por bacterias se encuentran; la producción de carbapenemasas, la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) combinado con la producción de AmpC; además de la desregulación de los canales de porinas (Marimuthu et al., 2019).

Durante décadas, los antibióticos han sido ampliamente utilizados en tratamientos terapéuticos en animales, siendo su objetivo principal el combatir infecciones previamente identificadas en un organismo vivo. No obstante, también se prescriben antibióticos para tratamientos no terapéuticos en donde el objetivo radica en promover una mayor productividad y crecimiento de animales, así como la prevención posibles infecciones provocadas por bacterias, hongos o virus (Ayukekbong, Ntemgwa, y Atabe, 2017). En Ecuador se ha reportado una tasa superior al 20% en prescripción antibiótica para su uso en bovinos y aves de corral en donde se destacan principalmente antibióticos como las cefalosporinas de tercera generación (CTG), cefalosporinas de cuarta generación (CCG), polimixinas y quinolonas (Martínez et al., 2023). En ganado porcino, por ejemplo, la aplicación antibiótica se lleva a cabo de forma profiláctica, es decir que se utilizan directamente antibióticos para el pre-tratamiento de animales sanos. El uso de antibióticos que tienen como finalidad el evitar la aparición de futuras enfermedades solo permite observar el uso sistémico, erróneo y rutinario de antibióticos en poblaciones considerablemente grandes (Boamah, Agyare, Odoi y Dalsgaard, 2016; Fraile, 2016).

El uso sistemático y excesivo de antibióticos como los betalactámicos y la colistina para el tratamiento de enfermedades infecciosas, especialmente en animales, provocan el surgimiento de microorganismo resistentes a los medicamentos desarrollados bajo una fuerte presión selectiva (Bacanli y Başaran, 2019; Terreni, Tacani y Pregnotato, 2021). La preocupación generada por el uso indebido de antibióticos en la industria animal ha conllevado a la prohibición de los mismos en distintos países a nivel mundial (Walsh y Wu, 2016). En China, por ejemplo, en abril de 2017, el Ministerio de Agricultura local prohibió el uso de colistina en aditivos de

alimentos para animales destinados al consumo humano (Zhao et al., 2022). En Ecuador, desde enero de 2019, La Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario (AGROCALIDAD) señala la prohibición de la producción, importación, comercialización y uso de productos que contengan principios activos de colistina destinados al uso o consumo en animales. Esa medida permitiría reducir y evitar el uso indiscriminado de colistina que regularmente es usado como promotor de crecimiento en animales (AGROCALIDAD, 2019).

En los últimos años, la aparición de bacterias multirresistentes ha provocado que, antibióticos que estaban estrictamente restringidos en medicina humana debido a su toxicidad, sean reintroducidos al mercado para tratar casos de resistencia a múltiples fármacos. Así, en el año 2012 un grupo de expertos sobre antimicrobianos de la OMS decidió incluir a la colistina como antibiótico de importancia crítica para la salud (WHO y AGISAR, 2017).

La colistina pertenece al grupo de antibióticos polipéptidos catiónicos también conocidos como polimixinas y es uno de los antibióticos ampliamente utilizados en medicina humana y animal (Stefaniuk y Tyski, 2019). Este antibiótico suele ser considerado como tratamiento de “última esperanza” en la práctica clínica debido a su efectividad para tratar patógenos Gram-negativos multirresistentes productores de carbapenemasas tipo KPC, NDM, OXA-48, entre otros (Aklilu et al., 2022; El-Sayed Ahmed et al., 2020; Ortega-Paredes, Barba y Zurita, 2016).

El antibiótico polipeptídico denominado colistina fue aislado de la bacteria Gram-positiva *Paenibacillus polymyxa* en 1947 (Benedict y Langlykke, 1947). La estructura de la colistina está constituida de un anillo peptídico catiónico conformado por siete aminoácidos unidos a una cola lipídica hidrófoba (Anexo 2) (Poirel, Jayol y Nordmann, 2017).

La resistencia a colistina está asociada a mutaciones cromosómicas y a transferencia de plásmidos portadores de genes de resistencia tipo MCR. En bacterias Gram-negativas como *Neisseria meningitides*, *Burkholderia* spp. y *P. mirabilis*, la resistencia a colistina es intrínseca, es decir que su configuración genética inhibe

naturalmente la acción farmacológica del antibiótico mediante mecanismos como la modificación del lipopolisacárido (LPS) de la fracción de la membrana citoplasmática. Este mecanismo permite evadir la acción de la colistina reduciendo o eliminando la interacción de carga negativa de la superficie bacteriana. La supresión de la interacción policatiónica entre la colistina y el LPS evita la desintegración de la membrana citoplasmática, la pérdida de contenido intracelular y, por consiguiente, la muerte celular (Gogry, Siddiqui, Sultan, y Haq, 2021). La resistencia intrínseca en *P. mirabilis* se debe a la expresión del operón *arnBCADTEF* y el gen *eptB*. Los mismos que se encargan de la modulación de carga catiónica en la membrana del LPS añadiendo grupos catiónicos (cargados positivamente) como PEtN (fosfoetanolamina), L-Ara-4N (4-amino-4-desoxi-L-arabinosa) a los grupos fosfatos en la posición 4' o 1' en el sitio de unión para las polimixinas (Poirel et al., 2017; Sun et al., 2017) (Anexo 3).

Dentro de los mecanismos de resistencia a colistina en enterobacterias están los mecanismos de naturaleza cromosómica los cuales son similares a los que ocurren en bacterias con resistencia intrínseca como *P. mirabilis*. En *E. coli* por ejemplo, las cepas resistentes a polimixinas generalmente realizan modificaciones en el LPS mediante la adición al lípido A de 2-aminoetanol y L-Ara-4N. La molécula 2-aminoetanol se añade al grupo difosfato por medio de un enlace glicosídico y L-Ara-4N se adiciona al fosfato en la posición 4' del lípido A. (Nummila Kilpeläinen, Zähringer, Vaara, y Helander, 1995).

Los primeros reportes sobre resistencia a colistina hacían referencia a mutaciones cromosómicas no transferibles en especies bacterianas como *Acinetobacter baumannii* (Moffatt et al., 2010) o *Klebsiella pneumoniae* (Cannatelli et al., 2013). Sin embargo, en 2015 se detectó la presencia del gen denominado *mcr* (por sus siglas en inglés "mobile colistin resistance") asociado a elementos genéticos móviles (plásmidos) que se encargan de la transferencia de material genético entre bacterias de una misma o distinta especie. Un estudio en China con 260 aislados de *E. coli* provenientes de seres humanos y animales de consumo humano permitió, por primera vez reportar a bacterias resistentes a colistina mediada por la presencia del plásmido MCR-1. Esto incrementó el espectro de resistencia a otros microorganismos

especialmente a bacterias entéricas (Liu et al., 2016). Hasta el momento se han identificado 10 alelos correspondientes a *mcr* (*mcr-1* al *mcr-10*), donde *mcr-1* es uno de los más estudiados en la actualidad (Anyanwu et al., 2021; El-Sayed Ahmed et al., 2020; Wang et al., 2020; Stefaniuk y Tyski, 2019). La secuencia de aminoácidos de la proteína MCR-1, codificada por el gen *mcr-1*, difiere de las otras proteínas cuyos porcentajes de similitud varían entre el 31 y el 82%. Para el gen *mcr-1* han sido asignados un total de 33 variantes genéticas funcionales (*mcr-1.1*, *mcr-1.2*, *mcr-1.3*... *mcr-1.33*) que se diferencian por la cantidad de aminoácidos presentes en las proteínas codificadas y con porcentajes de similitud de aproximadamente el 99%. Los alelos *mcr* y las subvariantes de *mcr-1* han sido reportados hasta el momento en cinco de los seis continentes: América, África, Asia, Europa y Oceanía. Se distribuyen en varios países en donde podría existir la posibilidad de una evolución continua del gen como consecuencia del aumento de mecanismos de los mecanismos de resistencia (Bao, Xu, Wang y Zhu, 2022; El-Sayed Ahmed et al., 2020; Muktan et al., 2020).

Varios estudios reportan la resistencia simultánea entre colistina y betalactámicos (CTG y carbapenémicos), asociada a mutaciones cromosómicas y a la transmisión de plásmidos por transferencia horizontal. Esto induce la proliferación y prevalencia de bacterias multirresistentes (Bastidas-Caldes et al., 2022a; Moghnieh, Moussa, Aziz y Matar, 2021; Osei Sekyere, 2019; Paitan, 2018; Zong, Feng y McNally, 2021).

La selección de una metodología estándar para la detección de la resistencia a colistina en Enterobacterias ha tenido un amplio debate debido a las diferencias que existen al comparar los resultados obtenidos por métodos fenotípicos (difusión de disco, dilución en caldo, mediante sistemas automatizados) que evalúan el perfil de resistencia a colistina. (Giske y Kahlmeter, 2018; Stefaniuk y Tyski, 2019). No obstante, en el año 2016 el CLSI (por sus siglas en inglés, "Clinical and Laboratory Standards Institute") y el EUCAST (por sus siglas en inglés, "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing") definieron como método estándar la prueba de dilución en caldo para el análisis de la MIC (concentración mínima inhibitoria) en colistina (CLSI, 2016; EUCAST, 2016). Las discrepancias existentes entre los resultados obtenidos fenotípicamente impulsan al uso e implementación de

metodologías genotípicas, como la amplificación de genes mediante PCR (por sus siglas en inglés, “polymerase chain reaction”), que facilitan la detección de genes relacionados con la resistencia bacteriana. Esto permite obtener resultados con una mayor eficiencia (Stefaniuk y Tyski, 2019).

### **3.1 OBJETIVOS**

#### **3.1.1 OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar de manera fenotípica y genotípica la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas en aislados resistentes a colistina obtenidos a partir de animales de granjas de la provincia de Imbabura.

#### **3.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Confirmar la identidad de los 30 aislados mediante pruebas bioquímicas y análisis MALDI-TOF.
- Identificar los aislados resistentes a colistina que producen de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas.
- Correlacionar la resistencia a colistina con la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas.
- Determinar la secuencia tipo (ST) a la que pertenecen los aislados estudiados mediante Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST).

## **4. METODOLOGÍA**

### **4.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO Y REIDENTIFICACIÓN DE AISLADOS BACTERIANOS**

La población de estudio considerada para este trabajo estuvo constituida por un grupo seleccionado de bacterias que formó parte del proyecto PUCE-2016 donde se colectaron un total de 188 muestras de hisopado cloacal y rectal de origen avícola y porcino, de 50 granjas y 10 camales de la provincia de Imbabura. Los aislados obtenidos forman parte de la Colección Bacteriana-Quito Católica (CB-QCA) del Laboratorio de Microbiología, de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. A partir de estas muestras fueron identificados 392 aislados bacterianos, a partir de los cuales se identificaron 101 aislados resistentes a colistina mediante el macrométodo de elución en caldo. A través del sistema automatizado VITEK 2 se identificaron 13 aislados productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y 19 aislados resistentes a carbapenémicos (datos no publicados). En total se seleccionó un grupo de 30 aislados caracterizados por presentar producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), carbapenemasas o por ser resistentes a colistina.

A pesar de que los aislados ya se encontraban identificados y preservados en el laboratorio de Microbiología de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, se realizó una reactivación, y reidentificación para descartar posibles contaminaciones o inactivación de los aislados.

Para la reactivación de los aislados se tomaron 14 copias bacterianas preservadas a -20 y -80 °C, que fueron transferidas a caldo BHI (por sus siglas en inglés, Brain Heart Infusion) (Difco™) y cultivadas a 37 °C durante 24 horas. Los 16 aislados restantes fueron activados a partir de poblaciones bacterianas conservadas en tubos con agar nutriente, a temperatura ambiente.

Una vez activados los 30 aislados en BHI, se tomó una mínima cantidad de caldo con un asa bacteriológica y se transfirió a placas de agar nutriente (Difco™), placas con agar EMB (Difco™) (por sus siglas en inglés, Eosin Methylene Blue) o a

placas de agar entérico Hektoen Enteric (Difco™). Los aislados fueron incubados a 37 °C durante 24 horas. Una vez obtenidas las colonias aisladas se procedió a realizar la identificación mediante las siguientes pruebas bioquímicas: Agar Citrato de Simmons (CIT), Sulfuro, Indol y Motilidad (SIM), Hierro-Triple azúcar (TSI), Rojo de metilo (RM), Voges Proskauer (VP), Urea, Fenilalanina (FA) y a Motilidad, Indol y Lisina (MILI) (Difco™).

#### **4.2. CONFIRMACIÓN FENOTÍPICA DE PRODUCCIÓN DE $\beta$ -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE), CARBAPENEMASAS Y RESISTENCIA ANTIBIÓTICA**

Una vez identificados los aislados se realizó la identificación fenotípica para la producción de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) mediante el método de Kirby-Bauer (Bauer, Kirby, Sherris y Turck, 1966). Cada aislado fue cultivado en 5 ml de caldo BHI a 37 °C durante 24 horas y posterior a ello se obtuvieron colonias aisladas en agar nutriente incubadas a 37 °C por 24 horas. Luego, se tomaron 3 a 5 colonias y se las transfirió a 500  $\mu$ l de caldo Müller-Hinton (Difco™) en una cuba Eppendorf para espectrofotometría para medir la turbidez de 0,5 en la escala de McFarland con ayuda del turbidímetro BioPhotometer plus (Eppendorf) alcanzando  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml. Posteriormente, la bacteria fue sembrada con un hisopo estéril sobre una placa Petri con agar Müller-Hinton (Difco™) realizando una distribución horizontal, vertical y diagonal, rotando la placa 180° sin dejar espacios libres en el medio de cultivo. Para confirmar si los aislados eran productores de BLEE, se colocaron 4 discos de antibióticos; ceftazidima (CAZ) 30  $\mu$ g, ceftazidima/ácido clavulanato (CZC) 40  $\mu$ g, cefotaxima (CTX) 30  $\mu$ g y cefotaxima/ ácido clavulanato (CTC) 40  $\mu$ g, sobre cada placa de agar de manera equidistante, siguiendo el método de doble disco recomendado por el CLSI (2022).

Mediante el método de difusión en disco Kirby-Bauer se realizó la evaluación fenotípica de la resistencia antibiética con antibióticos de las familias: aminoglucósidos, betalactámicos, y quinolonas. Por otra parte, y por el método de elución de disco en medio CAMBH se realizó la evaluación de la sensibilidad de los aislados con antibióticos de la familia lipopéptidos descritos en la Tabla 1.

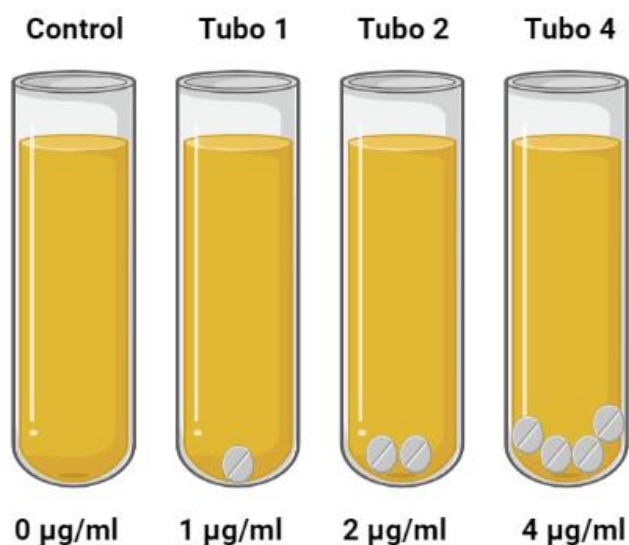
**Tabla 1. Clasificación, modo de acción, abreviatura, concentración y puntos de corte de los antibióticos utilizados en las evaluaciones fenotípicas.**

Clase	Subclase	Abreviatura	[ ]	Puntos de corte y categorías interpretativas en mm (para COL en µg/ml)		
				R	I	S
	AMP	AN	10 µg	≤13	14-16^	≥17
		CTX*	30 µg	≤22	23-25^	≥26
	CTG	CAZ*	30 µg	≤17	18-20^	≥21
		CRO	30 µg	≤19	20-22	≥23
<b>BETALACTÁMICOS</b>						
(Inhibición de síntesis de la pared celular)	CTG+INB	CTC*	40 µg	N/D	N/D	N/D
		CZC*	40 µg	N/D	N/D	N/D
		ETP	10 µg	≤18	19-21	≥22
	CBP	IPM	10 µg	≤19	20-22	≥23
		MEM	10 µg	≤19	20-22	≥23
<b>AMINOGLUCÓSIDOS</b>						
(Inhibición de síntesis proteica a nivel de la subunidad ribosomal 30S)	AMG	AM	30 µg	≤14	15-16^	≥17
		GM	10 µg	≤12	13-14^	≥15
<b>QUINOLONAS</b>						
(Bloqueo de la replicación y reparación de ADN)	QSG	CIP	5 µg	≤21	22-25^	≥26
<b>LIPOPEPTIDOS</b>						
(Alteración de la membrana celular)	PLX	COL	10 µg	N/D	≤2^	≥4

AMP, Aminopenicilinas; CTG, Cefalosporinas de Tercera Generación; CTG+INB, Cefalosporinas de Tercera Generación más Inhibidor de betalactamasas; CBP, Carbapenémicos; AMG, Aminoglucósidos; QSG, Quinolonas de Segunda Generación; PLX, Polimixinas; Meropenem (MEM); Ciprofloxacina (CIP); Amikacina (AM); Ertapenem (ETP); Imipenem (IPM); Ceftriaxona (CRO); Gentamicina (GM); Ceftazidima (CAZ); Ampicilina (AN); Cefotaxima (CTX); R, carácter resistente; I, carácter intermedio; S, carácter susceptible; N/D, datos no disponibles; \* antibióticos utilizados para detección de BLEE [ ], concentración del antibiótico; µg, microgramos

#### 4.3. PRUEBA DE SENSIBILIDAD A COLISTINA MEDIANTE ELUCIÓN EN CALDO

La sensibilidad a colistina se determinó mediante el método de elución de discos de colistina adaptado por el Laboratorio Nacional de Referencia en Antimicrobianos INEI-ANLIS “Dr. Carlos Malbran”, Argentina, y el CLSI (2022). El macrométodo utilizó discos de colistina (COL) de 10 µg en tubos con 10 ml de caldo Müller Hinton ajustado en cationes CAMBH (por sus siglas en inglés, Cation-Adjusted Mueller-Hinton Broth) (Figura 1). Para la preparación de CAMBH se utilizó caldo Müller Hinton (MHB) (Difco™) más dos soluciones catiónicas magnesio (Mg) y calcio (Ca). La solución stock de magnesio se preparó disolviendo 8,36 g de MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O en 100 ml de agua destilada autoclavada y para la solución stock de calcio se disolvió 3,68 g de CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O en la misma cantidad de agua destilada. Adicionalmente, se realizó una filtración por membrana para evitar contaminación. Finalmente, las soluciones fueron almacenadas a 4 °C.



**Figura 1. Ilustración gráfica del método de elución de disco en medio CAMBH.**

Una vez preparado el medio CAMBH, se distribuyó 10 ml de contenido en cada tubo, utilizando un total de 4 tubos por aislado que fueron rotulados como: “1, 2, 4 y Control”. Cada tubo representó la cantidad de discos de antibióticos/tubo. La colocación de los discos de colistina se la realizó con ayuda de una pinza estéril y se dejó los tubos a temperatura ambiente durante una hora para permitir que el antibiótico, contenido en los discos, se disuelva en el medio. Las cantidades finales

mostradas en cada tubo fueron: tubo control, sin antibiótico; tubo 1, 1 disco de COL 1 µg/ml; tubo 2, 2 discos de COL 2 µg/ml y tubo 4, 4 discos de COL 4 µg/ml. Con antelación, los aislados bacterianos probados crecieron en caldo TSB (por sus siglas en inglés Tryptic Soy Broth) (Difco™) por 18 horas a 37 °C. Luego, se obtuvo un inóculo correspondiente al  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml de la escala de McFarland que se calculó mediante un turbidímetro BioPhotometer plus (Eppendorf). Se tomaron 50 µl de inóculo con una pipeta y se transfirieron a tubos con medio CAMBH (4 tubos por aislado). Posteriormente, se incubó durante 18 horas a 37 °C.

#### **4.4. DETECCIÓN MOLECULAR DE GENES IMPLICADOS EN LA RESISTENCIA A BETALACTAMASAS Y A COLISTINA**

La amplificación de genes se llevó a cabo mediante PCR para lo cual se realizó extracciones de ADN utilizando el kit Wizard Genomic DNA Purification (PROMEGA). Como paso inicial, los 30 aislados fueron cultivados en 5 ml de caldo BHI (Difco™) a 37 °C durante 24 horas. Una vez obtenidos los aislados en el caldo se procedió a sembrar y aislar colonias en agar nutriente (Difco™) luego se incubó a 37 °C durante 24 horas. Finalmente se tomaron 5 colonias y se las cultivó en caldo TSB (Difco™) durante 18 horas.

El protocolo utilizado para la extracción de ADN fue descrito por el fabricante en el apartado "Isolation of Genomic DNA from Gram Positive and Gram Negative Bacteria": [https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protcards/wizard-genomic-dna-purification-kit-quick-protocol.pdf?rev=4cc2e14ff84c4281a97eb50b32755c33&sc\\_lang=en](https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protcards/wizard-genomic-dna-purification-kit-quick-protocol.pdf?rev=4cc2e14ff84c4281a97eb50b32755c33&sc_lang=en). Luego de la extracción de ADN se procedió a realizar la estandarización de protocolos para la amplificación de genes utilizando los iniciadores descritos en la Tabla 2.

**Tabla 2. Lista de cebadores utilizados en la amplificación y detección de genes**

Gen	Cebadores	Secuencias de los cebadores (5' - 3')	Tamaño del Amplicón en (pb)	Temperatura de anillamiento (°C)
<i>mcr-1</i>	F	AGTCCGTTTGTTCTTGTGGC	320	57
	R	AGATCCTTGGTCTCGGCTTG		
<i>mcr-2</i>	F	CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT	715	54
	R	TCTAGCCCCGACAAGCATACC		
<i>mcr-3</i>	F	AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG	929	48
	R	AATGGAGATCCCCGTTTTT		
<i>mcr-4</i>	F	TCACTTTCATCACTGCGTTG	1116	49
	R	TTGGTCCATGACTACCAATG		
<i>mcr-5</i>	F	ATGCGGTTGTCTGCATTTATC	1644	56
	R	TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG		
<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	F	SCSATGTGCAGYACCAGTAA	585	50
	R	CGCCRATATGRTTGGTGGTG		
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	F	ATGAGTATTCAACATTTCCG	858	55
	R	CCAATGCTTAATCAGTGAGG		
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	F	TGGTTATGCGTTATATTCGCC	862	55
	R	TCTTTCCGATGCCGCCGCCAGTCA		
<i>adk</i>	F	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG	583	54
	R	CCGTCAACTTTCGCGTATTT		
<i>fumC</i>	F	TCACAGGTGCCAGCGCTTC	806	54
	R	GTACGCAGCGAAAAGATTC		
<i>gyrB</i>	F	TCGGCGACACGGATGACGGC	911	60
	R	ATCAGGCCTTCACGCGCATC		
<i>lcd</i>	F	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCC	878	54
		GGCACA		
	R	GGACGCAGCAGGATCTGTT		
<i>mdh</i>	F	ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGC	932	60
		GCTGCTGGCGG		
	R	TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGC		
<i>purA</i>	F	GATATCTTTCTT	816	54
	R	CGCGCTGATGAAAGAGATGA		
<i>recA</i>	F	CATACGGTAAGCCACGCAGA	780	58
	R	CGCATTGCTTTACCCTGACC		
		TCGTCGAAATCTACGGACCGGA		

°C, grados centígrados; F, forward; R; reverse; pb, pares de bases

El volumen final de cada reacción de amplificación fue de 25 µl y estaba constituida por: 23 µl de mezcla madre más 2 µl de ADN, La mezcla madre se la realizó en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y contenía 12,5 µl DreamTaq Green PCR Master Mix (Promega), 1 µl por cebador (*mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*) y 8,5 µl agua libre de nucleasas. La distribución se realizó en tubos Eppendorf de 0,5 ml para posteriormente ser trasladados al termociclador.

Los programas de amplificación de genes se realizaon en el termociclador SimpliAmp™ Thermal Cycler A37835 (Thermo Fisher Scientific) Tabla 3.

**Tabla 3. Programación de termociclador para la amplificación de genes**

PROGRAMA	GEN	CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN
PCR-MULTIPLEX	<i>mcr-1</i>	
	<i>mcr-2</i>	30 ciclos de DSNTi a 94°C
	<i>mcr-3</i>	94 °C/30 s-
	<i>mcr-4</i>	58 °C/90 s-
	<i>mcr-5</i>	72 °C 60 s-
PCR ESTANDAR	<i>mcr-1</i>	30 ciclos de DSNTi a 94°C
		94 °C/45 s-
		60 °C/60 s- 72 °C/ 180 s-
PCR ESTANDAR	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	25 ciclos de DSNTi a 94°C
		95 °C/60 s-
		50 °C/60 s- 72 °C/ 60 s-
PCR ESTANDAR	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	30 ciclos de DSNTi a 94°C
		94 °C/60 s-
		54 °C/60 s-, 72 °C/120 s-
PCR ESTANDAR	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	30 ciclos de DSNTi a 94°C
		94 °C/ 30 s-,
		55 °C/30 s- 72 °C/60 s-

DSTNi, desnaturalización inicial; s-, segundos.

Los productos de amplificación obtenidos mediante PCR se visualizaron en el sistema electroforético ENDURO™ Gel XL (Labnet™) a un voltaje constante de 100 Voltios durante una hora en gel de agarosa al 2%. La preparación del buffer de corrida TBE 10X estaba compuesto por 55 g de ácido bórico, 108 g de Tris Base, 40 ml EDTA a 0,5 M. (77,4 g EDTA más 52,6 ml agua MiliQ). De ello, se utilizó 300 ml de TBE al 0.5X para la corrida electroforética.

Los productos de amplificación se compararon con una escalera molecular ADN (Ladder) de 100pb (Invitrogen) para determinar los tamaños. Como control positivo para el gen *mcr-1* se utilizó la cepa CB-QCA 109B (*E. coli*), como controles

positivos de BLEE se utilizaron cepas TEM y CTX-M además de la cepa “BLEE 4156” y como control negativo agua de grado molecular libre de nucleasas.

Para la visualización de los productos de amplificación se utilizó SYBR® Gold 10.000 x (Invitrogen™) y para la visualización de bandas se empleó el sistema de captura de imagen Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ (BIO-RAD) junto con el programa Image Lab Software.

#### **4.5. DETERMINACIÓN DE SECUENCIAS TIPO (ST) MEDIANTE TIPIFICACIÓN DE SECUENCIAS MULTILOCUS (MLST)**

La tipificación bacteriana por MLST se llevó a cabo siguiendo el protocolo recomendado por la Red de Laboratorios para la Vigilancia de Microorganismos Resistentes (RedLabRA, 2020), a partir de ADN extraído de los aislados de *E. coli* [https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/DiagnosticoMicrobiol%C3%B3gicoyProgramasVigilancia/Documents/RedLabRa-I-004-01.%20Protocolo\\_tipificacion\\_MLST.pdf](https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/DiagnosticoMicrobiol%C3%B3gicoyProgramasVigilancia/Documents/RedLabRa-I-004-01.%20Protocolo_tipificacion_MLST.pdf)

Se realizó una identificación de 7 genes conservados o “genes housekeeping”: (*adh*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*) utilizando los cebadores descritos en la Tabla 2.

La amplificación de genes mediante PCR tuvo un volumen final de 30 µl constituido por 29 µl de mezcla madre y 1 µl de ADN, el volumen de la mezcla madre estuvo compuesto por 13,5 µl de DreamTaq Green PCR Master Mix (Promega), 13,5 µl de agua libre de nucleasas, 1 µl de cebador en sentido directo (forward) y 1 µl de cebador en sentido reverso (reverse). Los productos de amplificación obtenidos por PCR se observaron por medio de electroforesis siguiendo la metodología descrita en el punto 4.6. La comprobación de productos amplificados se llevó a cabo utilizando el sistema Imager® Gel Doc™ XR+ (BIO-RAD) junto con el software informático Image Lab – Bio-Rad.

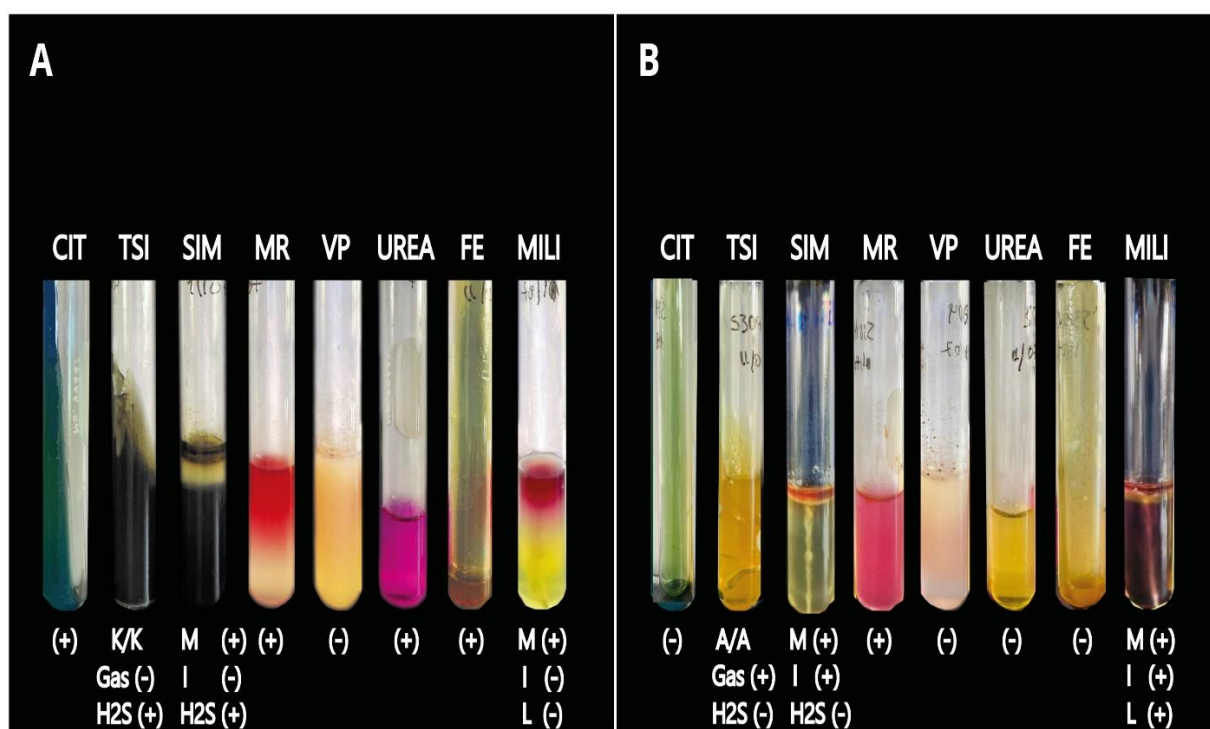
Una vez amplificados los 7 genes en los 11 aislados de *E. coli*, los productos PCR fueron enviados a la empresa MacroGen-Korea siguiendo los protocolos de ensamblaje y transporte descritos en el manual “DNA Order Guide”; CES-Sequencing Service: <https://dna.macrogen.com/com/comm/file/fileView.do> (MacroGen, 2020) con la finalidad de realizar una purificación y secuenciación estándar de los productos amplificados.

Con los resultados de la secuenciación se llevó a cabo la identificación de secuencias tipo (ST) mediante el análisis en PubMLST [https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst\\_escherichia\\_seqdef&page=downloadAlleles&tree=1](https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_escherichia_seqdef&page=downloadAlleles&tree=1) de donde se descargó las secuencias de referencia para comparar, cortar y alinear las secuencias obtenidas de los aislados mediante el programa bioinformático UGENE v43.0, luego se asignó un número de variante para cada gen: [https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst\\_escherichia\\_seqdef&page=sequenceQuery](https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_escherichia_seqdef&page=sequenceQuery) y finalmente se seleccionó una ST para cada combinación de locus en: [https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst\\_escherichia\\_seqdef&page=profiles](https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_escherichia_seqdef&page=profiles) (Jolley, Bray y Maiden, 2018).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO Y REIDENTIFICACIÓN DE AISLADOS BACTERIANOS

De los 30 aislados seleccionados, 27/30 (90%) fueron obtenidos mediante hisopado cloacal de pollos, mientras que los 3/30 (10%) aislados restantes pertenecían a aislado obtenidos mediante hisopado rectal de cerdos. En total se identificaron 18/30 (60%) aislados pertenecientes a la especie *Proteus mirabilis*, 11/30 (36,7%) a *Escherichia coli* y 1/30 (3,3%) aislado de *Enterococcus faecalis*. Todos los aislados fueron identificados mediante pruebas bioquímicas (Figura 2) y análisis MALDI-TOF (Tabla 4).



**Figura 2** Resultados de pruebas bioquímicas aplicadas para la confirmación de género y especies de los aislados. **A**, resultados del aislado CB-QCA 5376, identificación *P. mirabilis*; **B**, resultados del aislado CB-QCA 5304, identificación *E. coli*; M, motilidad; I, indol; L, lisina, H<sub>2</sub>S, producción de sulfuro de hidrógeno; K/K, alcalinidad en todo el medio, A/A, oxidación de azúcares y fermentación); (+), prueba positiva; (-) prueba negativa.

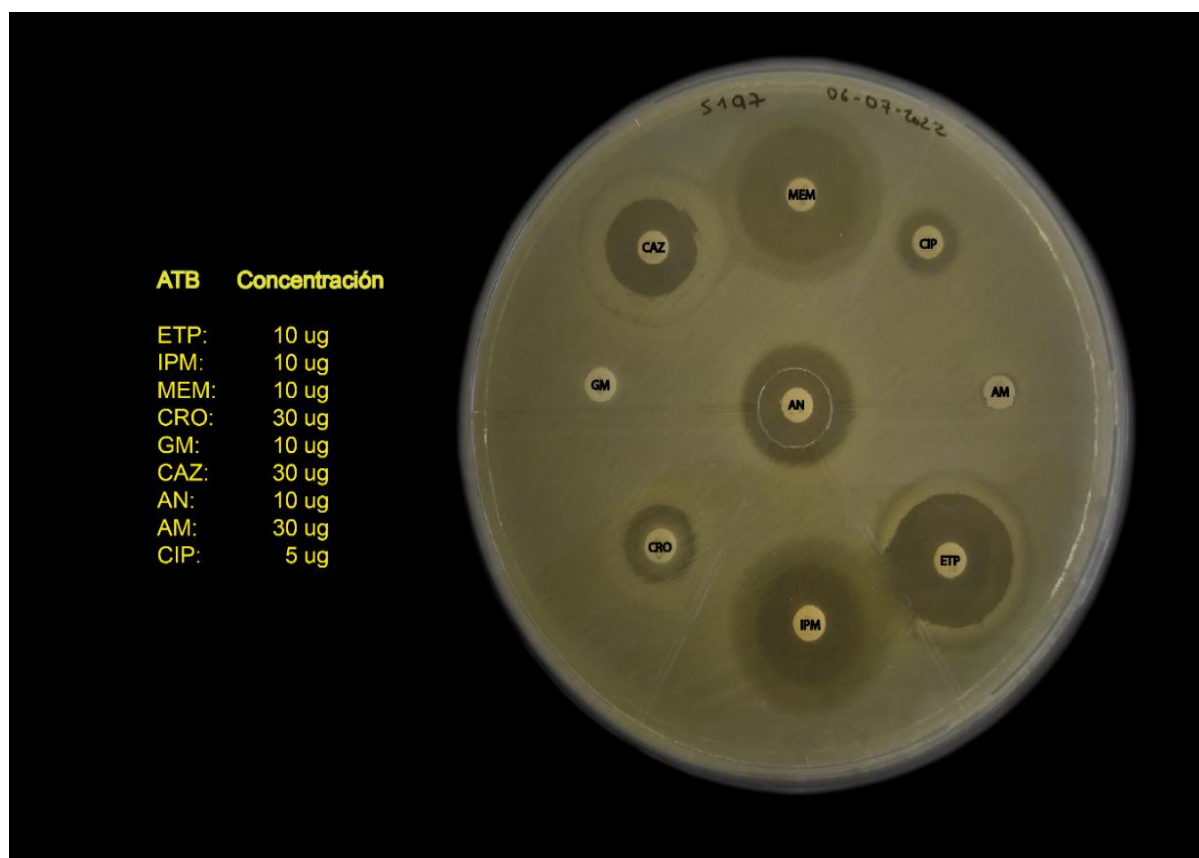
**Tabla 4. Datos de origen, fecha de aislamiento, identificación bioquímica e identificación MALDI-TOF de los aislados estudiados.**

Código PUCE	Fecha de aislamiento	Individuo	Muestra	Fecha de reactivación	Identificación bioquímica	Identificación MALDI-TOF
CB-QCA 5044	11/05/2018	Pollo	H.C	07/01/2022	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
CB-QCA 5047	11/05/2018	Pollo	H.C	07/01/2022	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
CB-QCA 5052	11/05/2018	Pollo	H.C	07/01/2022	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
CB-QCA 5054	11/05/2018	Pollo	H.C	07/01/2022	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
CB-QCA 5062	11/05/2018	Pollo	H.C	07/01/2022	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
CB-QCA 5063	11/05/2018	Pollo	H.C	07/01/2022	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
CB-QCA 5067	11/05/2018	Pollo	H.C	07/01/2022	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
CB-QCA 5134	14/06/2018	Pollo	H.C	07/01/2022	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
CB-QCA 5141	14/06/2018	Pollo	H.C	07/01/2022	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
CB-QCA 5150	14/06/2018	Pollo	H.C	07/01/2022	S/I	<i>Enterococcus faecalis</i>
CB-QCA 5152	14/06/2018	Pollo	H.C	07/01/2022	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
CB-QCA 5157	14/06/2018	Pollo	H.C	07/01/2022	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
CB-QCA 5162	14/06/2018	Pollo	H.C	07/01/2022	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
CB-QCA 5163	14/06/2018	Pollo	H.C	07/01/2022	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
CB-QCA 5179	14/06/2018	Pollo	H.C	07/01/2022	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
CB-QCA 5183	14/06/2018	Pollo	H.C	07/01/2022	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
CB-QCA 5196	14/06/2018	Pollo	H.C	07/01/2022	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
CB-QCA 5197	14/06/2018	Pollo	H.C	05/01/2022	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
CB-QCA 5201	14/06/2018	Pollo	H.C	05/01/2022	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
CB-QCA 5203	14/06/2018	Pollo	H.C	23/02/2022	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
CB-QCA 5208	14/06/2018	Pollo	H.C	07/01/2022	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
CB-QCA 5214	14/06/2018	Pollo	H.C	07/01/2022	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
CB-QCA 5215	14/06/2018	Pollo	H.C	07/01/2022	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
CB-QCA 5271	11/07/2018	Pollo	H.C	01/04/2022	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
CB-QCA 5304	11/07/2018	Pollo	H.C	08/05/2022	S/I	<i>Escherichia coli</i>
CB-QCA 5350	22/08/2018	Pollo	H.C	18/03/2022	S/I	<i>Proteus mirabilis</i>
CB-QCA 5376	22/08/2018	Cerdo	H.R	18/03/2022	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
CB-QCA 5381	22/08/2018	Pollo	H.C	11/01/2022	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
CB-QCA 5469	15/10/2018	Cerdo	H.R	11/01/2022	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
CB-QCA 5475	15/10/2018	Cerdo	H.R	11/01/2022	S/I	<i>Escherichia coli</i>

CB-QCA, Colección Bacteriana Quito-Católica; H.C, hisopado cloacal; H.R, hisopado rectal; S/I, Sin identificar.

## 5.2 DETECCIÓN FENOTÍPICA DE PRODUCCIÓN DE BETA-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE), CARBAPENEMASAS Y RESISTENCIA ANTIBIÓTICA

Mediante el método de Kirby-Bauer (Figura 3) se encontró que 24/30 (80%) de los aislados presentan perfiles de resistencia a antibióticos de clase beta-lactámico, 15/30 (50%) son resistentes a aminoglucósidos en donde 15/15 (100%) son resistentes a amikacina y 6/15 (40%) tienen resistencia a gentamicina. En total 28/30 (93,3%) aislados presentan perfiles de resistencia a ciprofloxacina siendo el antibiótico con mayor porcentaje de resistencia del total de aislados, valores representados en la Tabla 5.



**Figura 3** Imagen referencial sobre la metodología aplicada para evaluar la resistencia a antibióticos. Cepa CB-QCA 5197 (*Proteus mirabilis*); ATB, antibiótico; ETP, ertapenem; IPM, imipenem; MEM, meropenem; CRO, ceftriaxona; GM, gentamicina; CAZ, ceftazidima; AN, ampicilina; AM, amikacina; CIP, ciprofloxacina.

**Tabla 5. Valores de la sensibilidad antimicrobiana e interpretación de los 30 aislados analizados en el estudio**

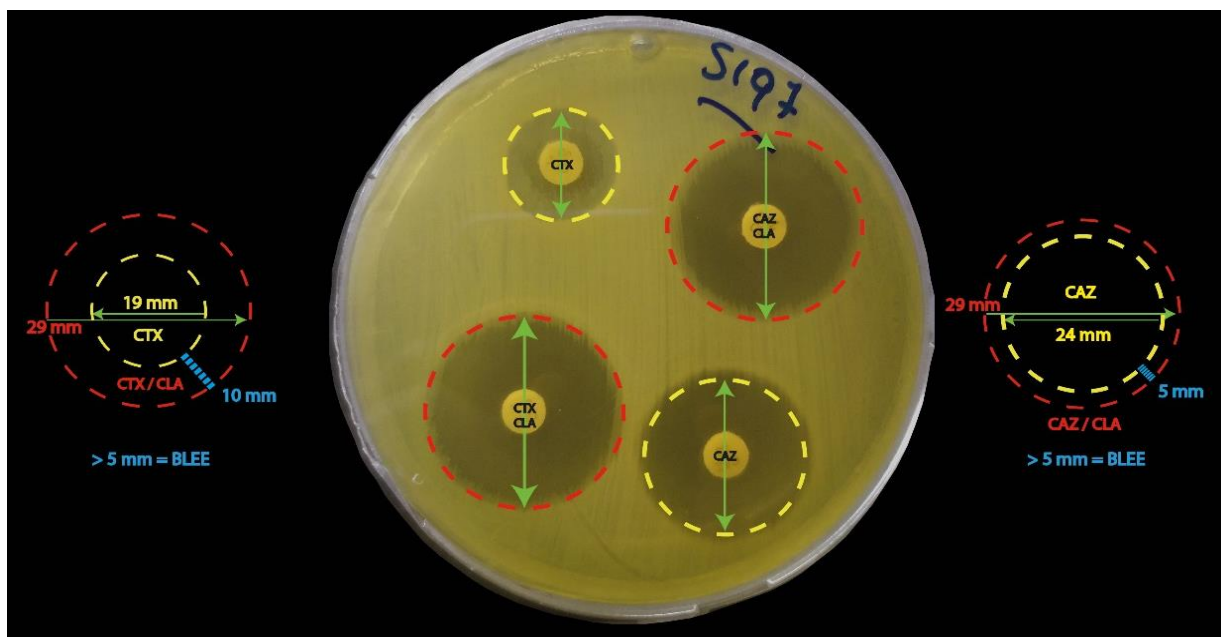
CÓDIGO PUCE	Betalactámicos										Aminoglucósidos		Quinolonas							
	MEM	ETP	IPM	CTX	CAZ	CRO	AN	GM	AM	CIP										
CB-QCA 5044	32	S	30	S	30	S	32	S	15	R	9	R	24	S	21	S	6	R	6	R
CB-QCA 5047	34	S	33	S	31	S	25	I	18	I	24	S	25	S	25	S	10	R	6	R
CB-QCA 5052	35	S	35	S	36	S	10	R	24	S	15	R	25	S	25	S	6	R	15	R
CB-QCA 5054	32	S	32	S	32	S	18	R	27	S	6	R	23	S	21	S	6	R	6	R
CB-QCA 5062	31	S	29	S	29	S	13	R	17	R	6	R	23	S	21	S	6	R	6	R
CB-QCA 5063	37	S	34	S	37	S	16	R	18	I	11	R	28	S	24	S	10	R	9	R
CB-QCA 5067	36	S	31	S	34	S	19	R	22	S	11	R	24	S	22	S	6	R	6	R
CB-QCA 5134	26	S	30	S	22	I	16	R	23	S	15	R	23	S	6	R	6	R	11	R
CB-QCA 5141	27	S	31	S	20	I	18	R	28	S	6	R	22	S	6	R	6	R	10	R
CB-QCA 5150	36	S	14	R	26	S	30	S	16	R	6	R	13	R	16	S	28	S	20	R
CB-QCA 5152	28	S	30	S	22	I	35	S	26	S	30	S	20	S	25	S	28	S	20	R
CB-QCA 5157	28	S	30	S	22	I	35	S	30	S	37	S	20	S	21	S	25	S	20	R
CB-QCA 5162	25	S	28	S	20	I	18	R	29	S	18	R	20	S	6	R	6	R	7	R
CB-QCA 5163	28	S	30	S	23	S	15	R	30	S	3	R	22	S	6	R	8	R	10	R
CB-QCA 5179	28	S	29	S	22	I	34	S	30	S	30	S	12	R	20	S	22	S	22	I
CB-QCA 5183	33	S	32	S	29	S	16	R	18	I	6	R	24	S	17	S	6	R	13	R
CB-QCA 5196	28	S	28	S	29	S	37	S	32	S	35	S	23	S	22	S	23	S	20	R
CB-QCA 5197	26	S	24	S	20	I	19	R	18	I	14	R	22	S	6	R	6	R	11	R
CB-QCA 5201	30	S	32	S	24	S	37	S	31	S	40	S	25	S	25	S	26	S	12	R
CB-QCA 5203	26	S	28	S	22	I	37	S	32	S	30	S	23	S	30	S	24	S	20	R
CB-QCA 5208	30	S	31	S	25	S	36	S	30	S	40	S	24	S	22	S	24	S	10	R
CB-QCA 5214	25	S	30	S	22	I	46	S	40	S	30	S	22	S	23	S	20	S	25	I
CB-QCA 5215	26	S	30	S	25	S	40	S	33	S	40	S	25	S	25	S	26	S	25	I
CB-QCA 5271	27	S	30	S	24	S	39	S	34	S	25	S	23	S	22	S	24	S	22	I
CB-QCA 5304	19	R	18	R	26	S	29	S	27	S	32	S	24	S	18	S	6	R	24	I
CB-QCA 5350	25	S	28	S	24	S	31	S	27	S	33	S	24	S	21	S	23	S	20	R
CB-QCA 5376	26	S	26	S	20	I	28	S	29	S	34	S	22	S	22	S	23	S	34	S
CB-QCA 5381	26	S	30	S	21	I	36	S	32	S	38	S	22	S	22	S	25	S	22	I
CB-QCA 5469	28	S	26	S	24	S	10	R	23	S	10	R	20	S	8	R	6	R	22	I
CB-QCA 5475	26	S	28	S	22	I	34	S	29	S	30	S	23	S	21	S	24	S	31	S

CB-QCA, Colección Bacteriana - Quito Católica; Meropenem (MEM); Ertapenem (ETP; Imipenem (IPM); Cefotaxima (CTX); Ceftazidima (CAZ); Ceftriaxona (CRO); Ampicilina (AN); Gentamicina (GM); Amikacina (AM); Ciprofloxacina (CIP); R, carácter resistente; I, carácter intermedio; S, carácter susceptible.

De los aislados resistentes a antibióticos betalactámico (24/30), 14/24 (58,3%) presentan resistencia antimicrobiana a por lo menos un antibiótico carbapenémico dentro de los cuales 12/14 (85,7%) presentan perfiles de resistencia a imipenem, 2/14 (14,3%) son resistentes a ertapenem y solo 1/14 (7,1%) aislado, es resistente a meropenem, el único aislado que presenta resistencia simultánea a ertapenem e imipenem es el aislado CB-QCA 5304 (*E. coli*). Solo 2/24 (8,3%) de los aislados presentan resistencia a antibióticos de clase aminopenicilina (Ampicilina 10 µg). Cabe destacar que para algunos de los casos los aislados interpretados como “intermedios” (I) fueron considerados como “resistentes” (R) para facilitar la interpretación de los resultados.

En cuanto a la resistencia a antibióticos de subclase CTG, 15/24 (62,5%) de los aislados presentan perfiles de resistencia a antibióticos en esta categoría, encontrándose un mayor porcentaje de resistencia a ceftriaxona en 14/15 (93,3%) de los aislados, seguido de cefotaxima en 13/15 (86,7%) aislados y ceftazidima en 7/15 (46,7%) aislados. Se encontraron 4/15 (26,7%) aislados con resistencia a los tres tipos de antibióticos simultáneamente.

La identificación de aislados productores de BLEE se llevó a cabo considerando los antibióticos de la subclase CTG más inhibidor de betalactamasas (cefotaxima/ácido clavulanato y ceftazidima/ácido clavulanato), encontrando que 14/30 (46,7%) aislados son productores de BLEE (Tabla 6) de los cuales, 12/14 (85,7%) aislados presentaron un halo igual o superior a 5 mm en la comparación entre cefotaxima y cefotaxima más inhibidor (ácido clavulanato) a diferencia de la comparación entre ceftazidima y ceftazidima más inhibidor que se encontró que el 64% (9/14) presentan un halo superior a la regla (Figura 4).



**Figura 4 Determinación fenotípica de la producción de BLEE.** CAZ, Ceftazidima; CAZ/CLA, Ceftazidima/ácido clavulanato; CTX, Cefotaxima; CTX/CLA, Cefotaxima/ácido clavulanato. Sinergia de doble disco sobre suspensión bacteriana utilizando discos de cefalosporinas (círculos puntuados amarillos) e inhibidores de betalactamasas (círculos puntuados rojos). La ampliación de halos de inhibición (> 5 mm) entre discos de cefalosporinas e inhibidor indica la producción de BLEE.

**Tabla 6. Confirmación fenotípica de la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) para los 30 aislados estudiados**

Código PUCE	Identificación MALDI-TOF	Aumento en el halo entre CAZ y CZC (mm)	Aumento en el halo entre CTX y CTC (mm)	CRITERIO CAZ - CZC	CRITERIO CTX y CTC
CB-QCA 5044	<i>Escherichia coli</i>	15	0	B	N
CB-QCA 5047	<i>Escherichia coli</i>	9	3	B	N
CB-QCA 5052	<i>Escherichia coli</i>	12	24	B	B
CB-QCA 5054	<i>Escherichia coli</i>	4	14	N	B
CB-QCA 5062	<i>Escherichia coli</i>	9	13	B	B
CB-QCA 5063	<i>Escherichia coli</i>	17	22	B	B
CB-QCA 5067	<i>Escherichia coli</i>	9	15	B	B
CB-QCA 5134	<i>Proteus mirabilis</i>	2	12	N	B
CB-QCA 5141	<i>Proteus mirabilis</i>	2	14	N	B
CB-QCA 5150	<i>Enterococcus faecalis</i>	2	0	N	N
CB-QCA 5152	<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	N	N
CB-QCA 5157	<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	N	N
CB-QCA 5162	<i>Proteus mirabilis</i>	1	14	N	B
CB-QCA 5163	<i>Proteus mirabilis</i>	1	15	N	B
CB-QCA 5179	<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	N	N
CB-QCA 5183	<i>Escherichia coli</i>	14	16	B	B
CB-QCA 5196	<i>Proteus mirabilis</i>	0	1	N	N
CB-QCA 5197	<i>Proteus mirabilis</i>	11	10	B	B
CB-QCA 5201	<i>Proteus mirabilis</i>	0	1	N	N
CB-QCA 5203	<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	N	N
CB-QCA 5208	<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	N	N
CB-QCA 5214	<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	N	N
CB-QCA 5215	<i>Proteus mirabilis</i>	3	0	N	N
CB-QCA 5271	<i>Proteus mirabilis</i>	2	0	N	N
CB-QCA 5304	<i>Escherichia coli</i>	1	1	N	N
CB-QCA 5350	<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	N	N
CB-QCA 5376	<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	N	N
CB-QCA 5381	<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	N	N
CB-QCA 5469	<i>Escherichia coli</i>	6	18	B	B
CB-QCA 5475	<i>Escherichia coli</i>	1	0	N	N

CB-QCA, Colección Bacteriana – Quito Católica; B, halo de inhibición superior a 5 mm, productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE); N, halo de inhibición menor a 5 mm, no productor de BLEE.

Se evaluaron un total de 11 antibióticos para cada uno de los aislados en donde ciertos aislados presentaron resistencia hasta 8/11 (72,7%) siendo 2/11 (18,2%) la cantidad más baja de resistencia a antibiótica, en la Figura 5 se detalla las cantidades de perfiles de resistencia por aislado.

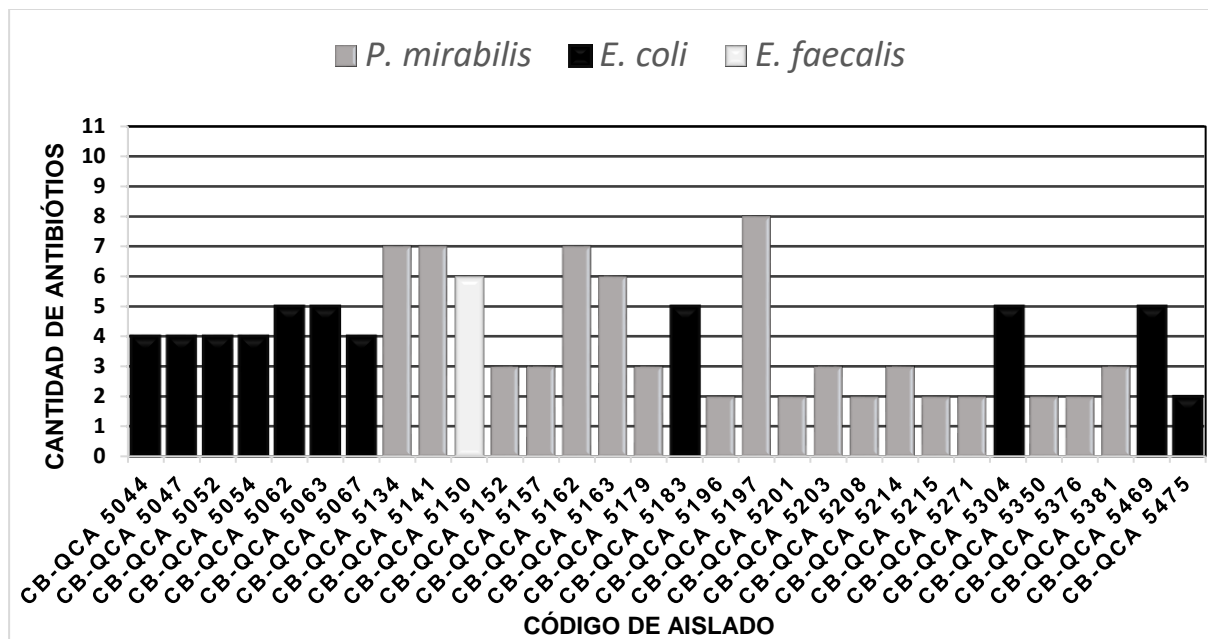


Figura 5 Perfiles de resistencia antibiótica totales por cada aislado.

El antibiótico con mayor cantidad de perfiles de resistencia los resultados fue meropenem mientras que meropenem fue el antibiótico más eficaz y con menos cantidad perfiles de resistencia (1/30) (Figura 6).

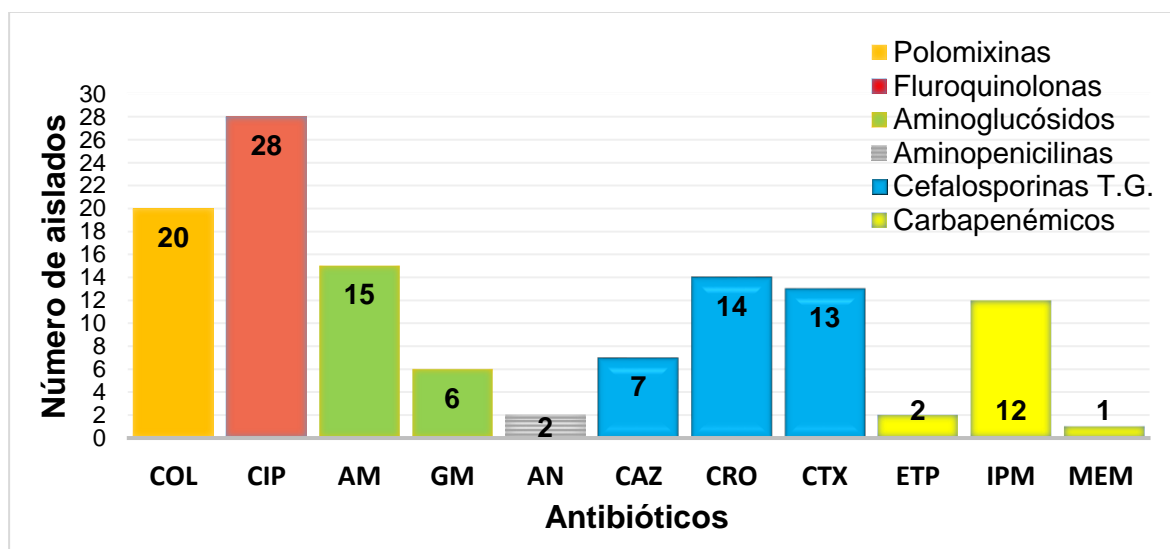


Figura 6 Perfiles de resistencia por antibiótico COL, colistina; CIP, ciprofloxacina; AM, amikacina; GM, gentamicina; AN, Ampicilina; CAZ, ceftazidima; CRO, ceftriaxona; CTX, cefotaxima; ETP, ertapenem; IPM, imipenem; MEM, meropenem.

DE los 30 aislados en estudio, 4/30 (13,3%) aislados presentan resistencia fenotípica combinada a las 3 clases de antibióticos (cefalosporina, carbapenémicos y colistina), todos correspondientes a bacterias de la especie *P. mirabilis*. Solo 9/30 (30%) aislados son resistentes a carbapenémicos y a colistina en simultáneo y no son productores de BLEE. En la determinación de resistencia simultánea de forma genotípica, se llegó a identificar genes relacionados con la producción de BLEE (Tabla 7).

**Tabla 7. Aislados que presentan resistencia fenotípica simultánea y presencia de genes.**

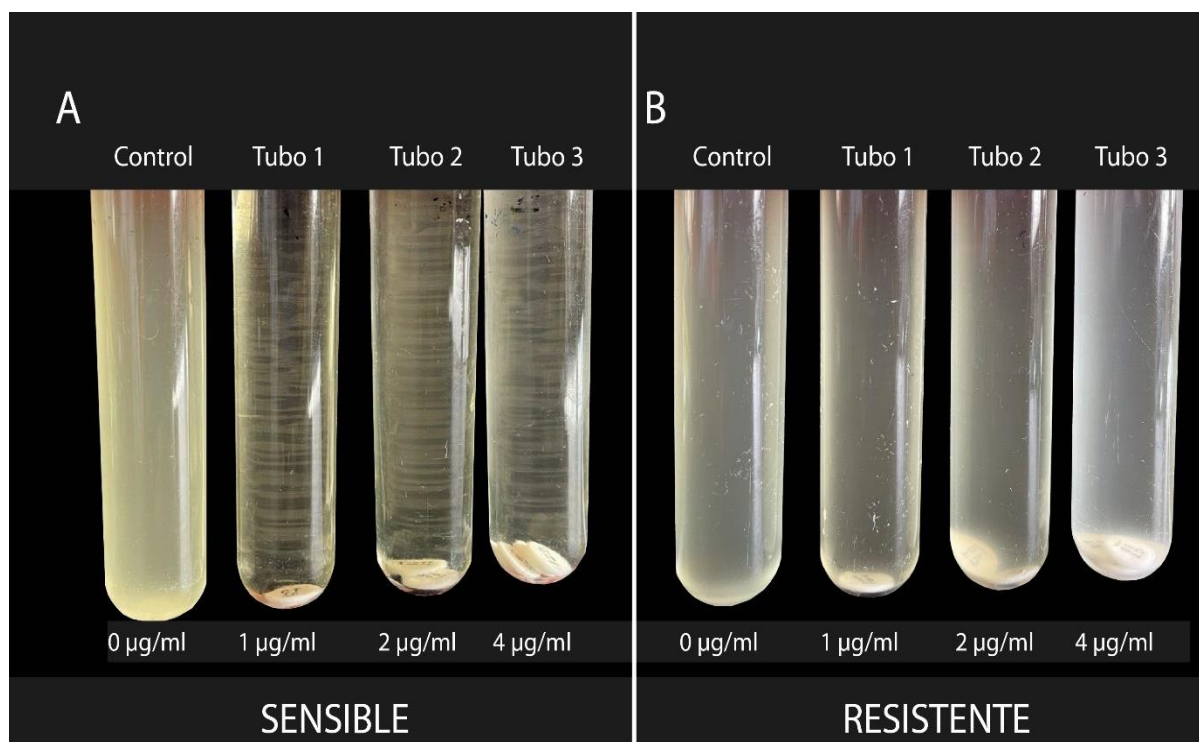
Código PUCE	Identificación MALDITOF	Interpretación de resistencia a antibióticos				BLEE	Detección de genes							
		MEM	ETP	IMP	COL		<i>mcr-1</i>	<i>mcr-2</i>	<i>mcr-3</i>	<i>mcr-4</i>	<i>mcr-5</i>	<i>bla<sub>CTX</sub></i>	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	<i>bla<sub>TEM</sub></i>
CB-QCA 5134	<i>Proteus mirabilis</i>	S	S	I	R	Si	A	A	A	A	A	P	P	A
CB-QCA 5141	<i>Proteus mirabilis</i>	S	S	I	R	Si	A	A	A	A	A	P	A	P
CB-QCA 5150	<i>Enterococcus faecalis</i>	S	R	S	R	No	A	A	A	A	A	A	A	A
CB-QCA 5152	<i>Proteus mirabilis</i>	S	S	I	R	No	A	A	A	A	A	A	A	A
CB-QCA 5157	<i>Proteus mirabilis</i>	S	S	I	R	No	A	A	A	A	A	A	A	A
CB-QCA 5162	<i>Proteus mirabilis</i>	S	S	I	R	Si	A	A	A	A	A	P	P	P
CB-QCA 5197	<i>Proteus mirabilis</i>	S	S	I	R	Si	A	A	A	A	A	P	P	P
CB-QCA 5203	<i>Proteus mirabilis</i>	S	S	I	R	No	A	A	A	A	A	A	A	A
CB-QCA 5214	<i>Proteus mirabilis</i>	S	S	I	R	No	A	A	A	A	A	A	A	A
CB-QCA 5304	<i>Escherichia coli</i>	R	R	I	R	No	A	A	A	A	A	A	A	P
CB-QCA 5376	<i>Proteus mirabilis</i>	S	S	I	R	No	A	A	A	A	A	A	A	A
CB-QCA 5381	<i>Proteus mirabilis</i>	S	S	I	R	No	A	A	A	A	A	A	A	A
CB-QCA 5475	<i>Escherichia coli</i>	S	S	I	R	No	A	A	A	A	A	A	A	A

R, carácter resistente; I, carácter intermedio; "S", carácter sensible; "Si", producción de betalactamasas de espectro extendido; No, no productor de BLEE; A, gen ausente; P, presencia del gen; COL, colistina; MEM, meropenem; ETP, ertapenem; IMP, imipenem.

### 5.3 DETECCIÓN FENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA A COLISTINA

Del total de aislados, 21/30 (70%) presentaron resistencia fenotípica a colistina, los puntos de corte e interpretación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) fueron

tomados del CLSI (2022), evaluando concentraciones de 1, 2 y 4  $\mu\text{g/ml}$ , observando crecimiento en cada una de las concentraciones (Figura 7).



**Figura 7** Imágenes referenciales sobre la prueba de sensibilidad a colistina por elución en medio CAMBH. Tubos control presentan turbidez indicando crecimiento del aislado en medio CAMBH, tubos sin turbidez indican sensibilidad a COL. **A**, prueba de sensibilidad aislado CB-QCA 5044; tubo control (+), tubos 1, 2 y 3 sensibles a COL (-). **B**, prueba de sensibilidad aislado CB-QCA 5197; tubo control (+), tubos 1, 2 y 3 con turbidez (+) resistentes a COL por cada concentración antibiótica.

De los 11 aislados identificados como *E. coli*, solo 2/11 (18,2%) presentaron resistencia fenotípica a colistina, mientras que de los 18 aislados identificados como *P. mirabilis*, 18/18 (100%) de los aislados fueron resistentes, finalmente el único aislado identificado como *E. faecalis*, es resistente a colistina (Tabla 8).

**Tabla 8 Resultados de la prueba de elusión en disco CAMBH.**

Código PUCE	Tubo control (0 µg/ml)	Tubo 1 (1 µg/ml)	Tubo 2 (2 µg /ml)	Tubo 4 (4 µg /ml)	Interpretación
CB-QCA 5044	P	N	N	N	S
CB-QCA 5047	P	N	N	N	S
CB-QCA 5052	P	N	N	N	S
CB-QCA 5054	P	N	N	N	S
CB-QCA 5062	P	N	N	N	S
CB-QCA 5063	P	N	N	N	S
CB-QCA 5067	P	N	N	N	S
CB-QCA 5134	P	P	P	P	R
CB-QCA 5141	P	P	P	P	R
CB-QCA 5150	P	P	P	P	R
CB-QCA 5152	P	P	P	P	R
CB-QCA 5157	P	P	P	P	R
CB-QCA 5162	P	P	P	P	R
CB-QCA 5163	P	P	P	P	R
CB-QCA 5179	P	N	N	N	R
CB-QCA 5183	P	N	N	N	S
CB-QCA 5196	P	P	P	P	R
CB-QCA 5197	P	P	P	P	R
CB-QCA 5201	P	P	P	P	R
CB-QCA 5203	P	P	P	P	R
CB-QCA 5208	P	P	P	P	R
CB-QCA 5214	P	P	P	P	R
CB-QCA 5215	P	P	P	P	R
CB-QCA 5271	P	P	P	P	R
CB-QCA 5304	P	P	P	P	R
CB-QCA 5350	P	P	P	P	R
CB-QCA 5376	P	P	P	P	R
CB-QCA 5381	P	P	P	P	R
CB-QCA 5469	P	N	N	N	S
CB-QCA 5475	P	P	P	P	R
CB-QCA 109B*	P	P	P	P	R

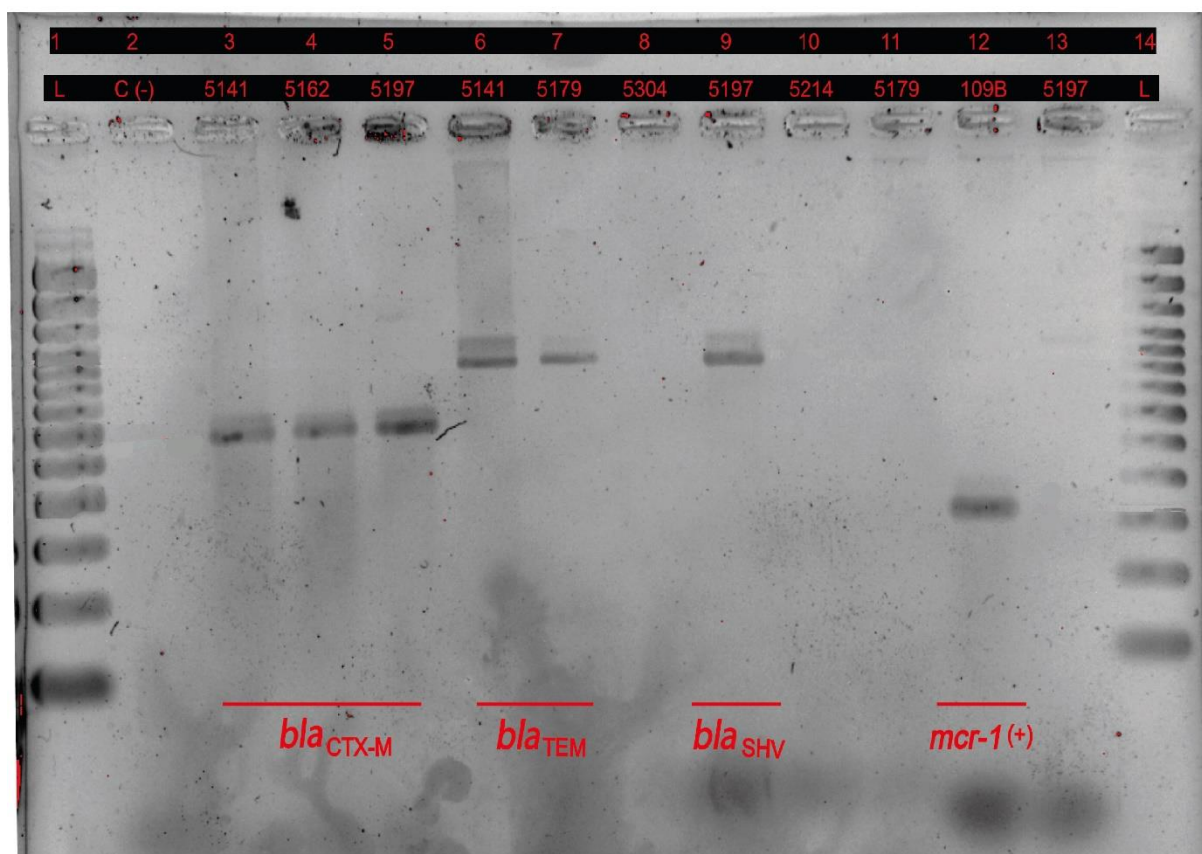
CB-QCA, Colección Bacteriana – Quito Católica; CB-QCA 109B\*, aislado control positivo resistente a colistina; P, crecimiento positivo; N, crecimiento negativo; R, carácter resistente; S, carácter sensible.

#### 5.4 DETECCIÓN MOLECULAR DE PRESENCIA DE GENES IMPLICADOS EN LA RESISTENCIA A BETALACTAMASAS Y COLISTINA

La visualización de genes estuvo constituida por dos grupos; el primer grupo constituido por genes codificantes de betalactamasas (*bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>) en donde el gen *bla*<sub>CTX-M</sub> se observó en 14/30 (46,7%) de los aislados, *bla*<sub>TEM</sub> en 9/30

(30%) de aislados y *bla<sub>SHV</sub>* en 8/30 (26,7%) del total de aislados. El segundo grupo constituido por genes MCR de la familia fosfoetanolamina transferasa (*mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*) (Tabla 9) en donde no se logró observar la presencia de genes mediante ninguno de los programas de amplificación descritos en la Tabla 3. El resumen de presencia de genes de los 30 aislados se describe en la Tabla 8 y Anexo 5.

Los tamaños de los amplicones observados fueron; de 585 pares de bases (pb) para el gen *bla<sub>CTX-M</sub>* 858 pb, el gen *bla<sub>TEM</sub>*, con 862 pb, el gen *bla<sub>SHV</sub>* con 320 de pb y el gen *mcr-1* con 320 pb (Figura 8).



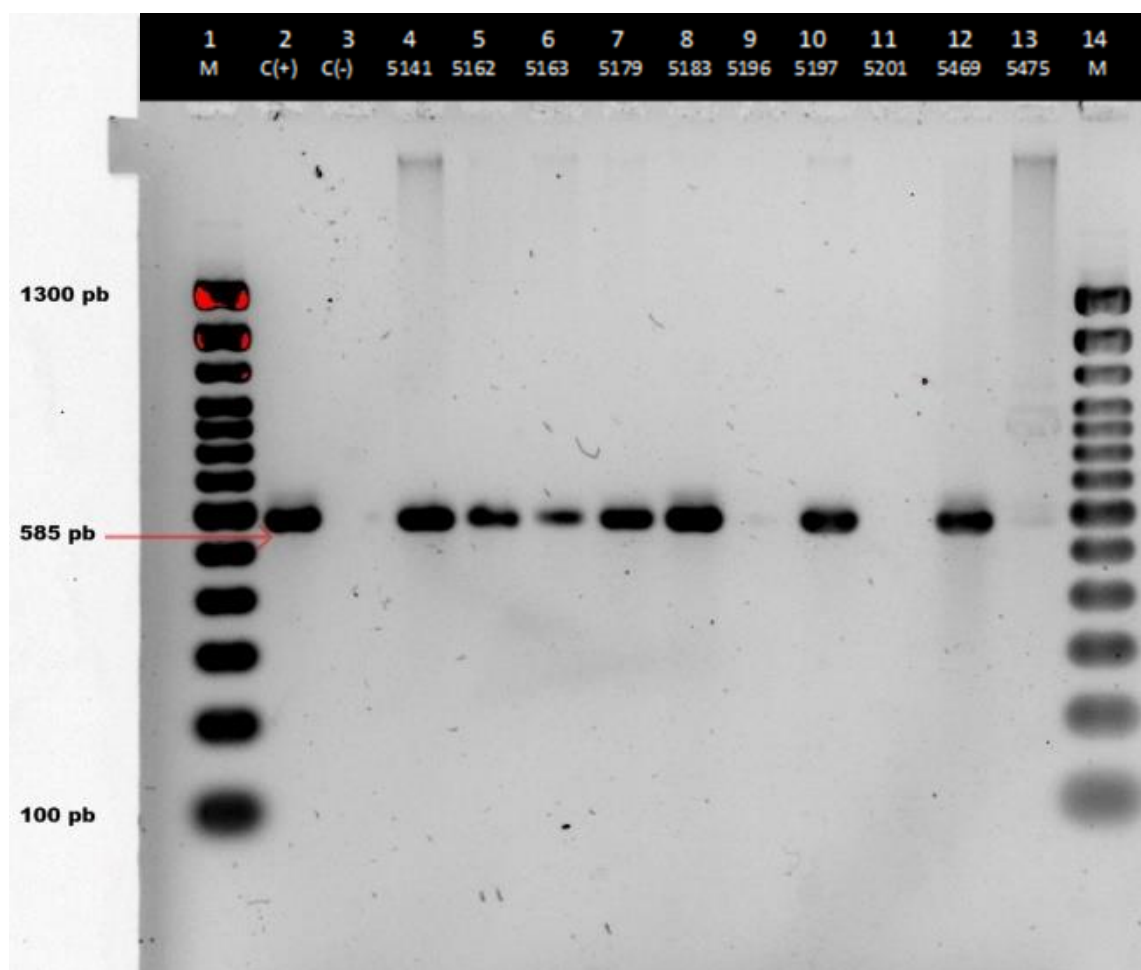
**Figura 8. Gel de agarosa representativo para genes BLEE y *mcr* con productos amplificados mediante PCR.** Carriles 1 y 14, 1: (M) marcador de peso molecular (100 pb); 2, control negativo; 3, 4 y 5 positivo para *bla<sub>CTX-M</sub>*; 6 y 7, positivos para *bla<sub>TEM</sub>*; 8, negativo para *bla<sub>TEM</sub>*; 9, positivo para *bla<sub>SHV</sub>*; 10 y 11, negativos para *bla<sub>TEM</sub>*; 12, control positivo *mcr-1*; 13, control negativo *mcr-1*.

**Tabla 9. Resumen de detección de genes amplificados**

Código PUCE	Identificación MALDI-TOF	Alelos gen <i>mcr</i>					Genes BLEE		
		<i>mcr-1</i>	<i>mcr-2</i>	<i>mcr-3</i>	<i>mcr-4</i>	<i>mcr-5</i>	<i>bla</i> <sub>CTXm</sub>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
CB-QCA 5044	<i>Escherichia coli</i>	A	A	A	A	A	P	P	A
CB-QCA 5047	<i>Escherichia coli</i>	A	A	A	A	A	A	P	P
CB-QCA 5052	<i>Escherichia coli</i>	A	A	A	A	A	P	P	P
CB-QCA 5054	<i>Escherichia coli</i>	A	A	A	A	A	P	A	A
CB-QCA 5062	<i>Escherichia coli</i>	A	A	A	A	A	P	P	A
CB-QCA 5063	<i>Escherichia coli</i>	A	A	A	A	A	P	P	A
CB-QCA 5067	<i>Escherichia coli</i>	A	A	A	A	A	P	A	A
CB-QCA 5134	<i>Proteus mirabilis</i>	A	A	A	A	A	P	P	A
CB-QCA 5141	<i>Proteus mirabilis</i>	A	A	A	A	A	P	A	P
CB-QCA 5150	<i>Enterococcus faecalis</i>	A	A	A	A	A	A	A	A
CB-QCA 5152	<i>Proteus mirabilis</i>	A	A	A	A	A	A	A	A
CB-QCA 5157	<i>Proteus mirabilis</i>	A	A	A	A	A	A	A	A
CB-QCA 5162	<i>Proteus mirabilis</i>	A	A	A	A	A	P	P	P
CB-QCA 5163	<i>Proteus mirabilis</i>	A	A	A	A	A	P	A	P
CB-QCA 5179	<i>Proteus mirabilis</i>	A	A	A	A	A	P	A	P
CB-QCA 5183	<i>Escherichia coli</i>	A	A	A	A	A	P	A	P
CB-QCA 5196	<i>Proteus mirabilis</i>	A	A	A	A	A	A	A	A
CB-QCA 5197	<i>Proteus mirabilis</i>	A	A	A	A	A	P	P	P
CB-QCA 5201	<i>Proteus mirabilis</i>	A	A	A	A	A	A	A	A
CB-QCA 5203	<i>Proteus mirabilis</i>	A	A	A	A	A	A	A	A
CB-QCA 5208	<i>Proteus mirabilis</i>	A	A	A	A	A	A	A	A
CB-QCA 5214	<i>Proteus mirabilis</i>	A	A	A	A	A	A	A	A
CB-QCA 5215	<i>Proteus mirabilis</i>	A	A	A	A	A	A	A	A
CB-QCA 5271	<i>Proteus mirabilis</i>	A	A	A	A	A	A	A	A
CB-QCA 5304	<i>Escherichia coli</i>	A	A	A	A	A	A	A	P
CB-QCA 5350	<i>Proteus mirabilis</i>	A	A	A	A	A	A	A	A
CB-QCA 5376	<i>Proteus mirabilis</i>	A	A	A	A	A	A	A	A
CB-QCA 5381	<i>Proteus mirabilis</i>	A	A	A	A	A	A	A	A
CB-QCA 5469	<i>Escherichia coli</i>	A	A	A	A	A	P	A	A
CB-QCA 5475	<i>Escherichia coli</i>	A	A	A	A	A	A	A	A

CB-QCA, Colección Bacteriana Quito-Católica; A, gen ausente; P, gen presente.

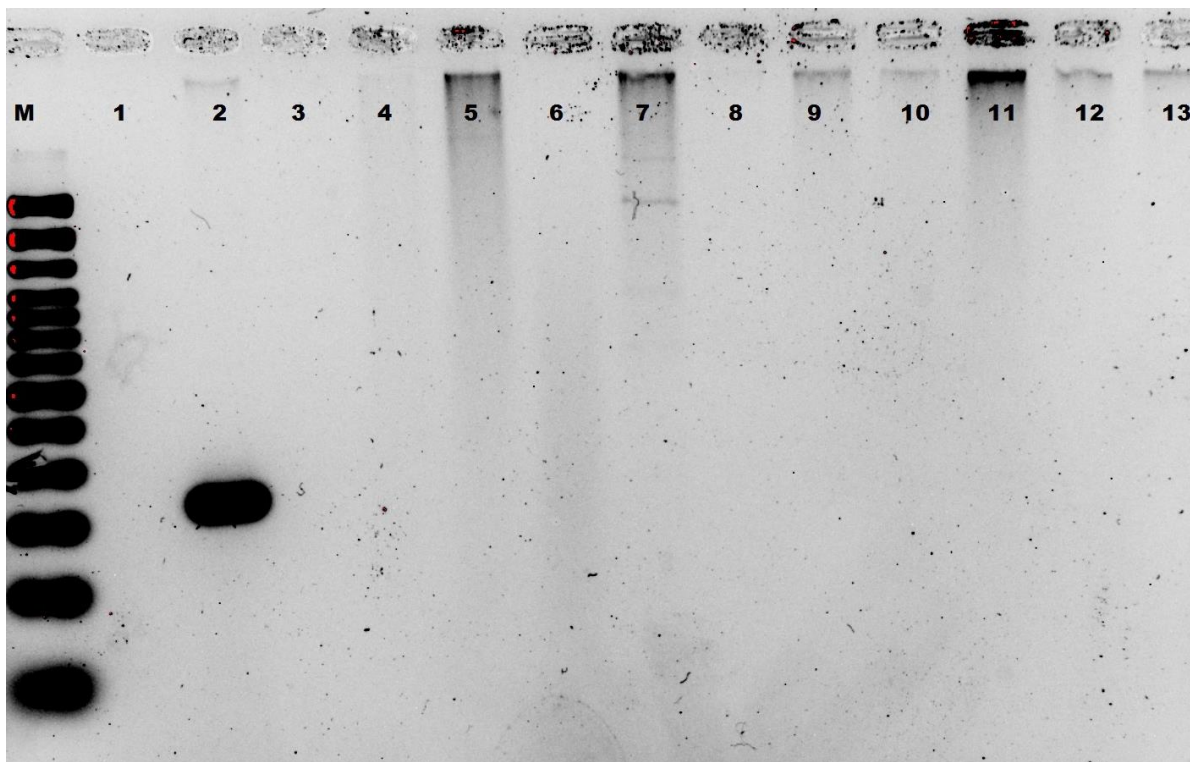
De los 30 aislados analizados, 14/30 (46,7%) refleja la presencia de bandas aproximadamente a 585 pb que indican la presencia del gen *bla*<sub>CTX-M</sub> (Figura 9).



**Figura 9. Gel representativo de la detección de genes *bla*<sub>CTX-M</sub> de los aislados obtenidos de granjas de la provincia de Imbabura.**

Carriles 1 y 14 (M), Marcador de peso molecular (100 pb); 2, Control positivo; 3, Control negativo; Carriles del 4-13, Muestras representativas analizadas en el estudio.

En cuanto a los resultados obtenidos para la detección de genes de tipo *mcr* y sus variantes (*mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* y *mcr-5*) no se observó ninguna banda a excepción de la cepa control Figura 10. Tanto por el método de PCR estándar como PCR múltiple, no se logró observar bandas que corroboren la amplificación de genes *mcr*.



**Figura 10. Gel representativo de la detección de genes *mcr-1* de los aislados.** Carril M, escalera molecular; carril 1, control (-); carril 2, control (+) gen *mcr-1*; carriles 3-13 ausencia de genes *mcr-1*.

## 5.5 TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS POR SECUENCIAS MULTILOCUS (MLST)

En los 11 aislados identificados como *E. coli*, se identificaron un total de 7 secuencias tipo (ST): ST90, ST101, ST624 ST655, ST1589, ST3596, ST3856. Adicionalmente, se realizó el análisis MLST para la cepa control de *mcr-1* (CB-QCA 109B) identificando la ST como ST655. De las 7 secuencias tipo, dos coincidieron en relación con los aislados CB-QCA 5047 y CB-QCA 5067, aislados obtenidos de distintas parroquias de la provincia de Imbabura (Anexo 1). Las 5 ST restantes coincidieron individualmente con cada uno de los aislados descritos en la Tabla 10. Finalmente existieron 4 secuencias que no coincidieron con los datos disponibles en PubMLST.

**Tabla 10. Perfiles alélicos obtenidos para los genes conservados “housekeeping” de *Escherichia coli* y la ST asignada mediante MLST.**

Código PUCE	Genes MLST para <i>E. coli</i>							ST PubMLST	Complejo Clonal
	<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>		
CB-QCA 109-B*	122	11	125	12	96	8	2	655	N/D
CB-QCA 5044	6	4	12	1171	20	8	7	S/D	N/D
CB-QCA 5047	6	4	12	16	7	5	6	1589	N/D
CB-QCA 5052	6	4	33	16	1104	8	650	S/D	N/D
CB-QCA 5054	92	4	87	96	70	58	91	624	ST648 Cplx
CB-QCA 5062	6	4	12	1171	20	8	7	S/D	N/D
CB-QCA 5063	6	4	12	1	20	8	7	90	ST23 Cplx
CB-QCA 5067	6	4	12	16	7	5	6	1589	N/D
CB-QCA 5183	6	31	834	28	384	1	671	S/D	N/D
CB-QCA 5304	10	7	5	8	8	2	2	3856	N/D
CB-QCA 5469	43	41	15	18	11	7	6	101	ST101 Cplx
CB-QCA 5475	10	11	4	8	298	8	2	3596	N/D

CB-QCA, Colección Bacteriana - Quito Católica; Cplx, complejo clonal; S/D, sin definir; ST, Secuencia tipo; N/D, no definido; “\*”, Aislado control positivo *mcr-1*.

## 6. DISCUSIÓN

Este es el primer estudio realizado con aislados de origen avícola y porcino colectados en granjas ubicadas en parroquias de la provincia de Imbabura en el que se destaca un enfoque centrado en el análisis fenotípico y genotípico de la resistencia a múltiples fármacos. En mayor porcentaje la población de estudio perteneció a muestras tomadas a partir de cloacas de aves (70%) siendo *Proteus mirabilis* la especie con mayor prevalencia seguida de *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*, el 30% restante corresponde a muestras obtenidas a partir de hisopado rectal en cerdos identificando dos aislados de *E. coli* y uno de *P. mirabilis*.

La aparición de bacterias con perfiles de resistencia simultánea ha propiciado la ejecución de un amplio número de estudios a nivel global en enterobacterias. Varios de estos estudios se desarrollan en distintos ambientes, entre ellos las granjas destinadas a la crianza masiva de animales destinados a la producción de cárnicos y derivados para el consumo humano (Aklilu et al., 2022; Aklilu y Raman, 2020; Dandachi, Chabou, Daoud y Rolain, 2018; Founou, Founou y Essack, 2016; Muktan et al., 2020; Nagy, Székelyhidi, Lakatos y Kapcsándi, 2021; Uddin et al., 2022).

La mayor parte de los aislados con perfiles de resistencia a imipenem pertenecen a la especie *P. mirabilis*, mientras que la resistencia a meropenem se confirmó en un solo aislado de *E. coli* el cual también presentó resistencia a ertapenem junto al único aislado Gram-positivo identificado como *E. faecalis*. Se reporta que durante la década de 1990 la resistencia a betalactámicos específicamente las CTG, en enterobacterias era entre el 10 y el 15%, no obstante, para los años 2013-2016 el porcentaje alcanzó valores de resistencia superiores al el 20% (Castanheira et al., 2019). *P. mirabilis* es considerado como un patógeno oportunista capaz de causar importantes infecciones urinarias, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos debido a su capacidad de colonizar distintos entornos como el tracto intestinal de humanos y animales (Drzewiecka, 2016). En un estudio realizado por Li y colaboradores (2022) en granjas de pollos de engorde, se reportó que la mayoría de aislados MDR de *P. mirabilis* eran resistentes de entre 9 y 12 de los antibióticos utilizados en el estudio representando el 76% del total de aislados analizados.

Además, se reportó la presencia de 24 genes que confieren resistencia a fármacos en los que se destaca la presencia de genes como; *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>, promotores de resistencia a betalactámicos y *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub> como promotores de la resistencia a carbapenémicos. La evidencia de genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> en los aislados identificados como *P. mirabilis* se correlaciona con la alta tasa de resistencia fenotípica (hasta 8/11 antibióticos) considerando a 5/18 (27,8%) como MDR.

Estos parámetros nos permiten reafirmar el amplio espectro de resistencia de *P. mirabilis* corroborados con la literatura tanto a nivel fenotípico como molecular. Se destaca una menor resistencia a antibióticos CTG para *P. mirabilis* y un alto porcentaje de resistencia ciprofloxacina al igual que en *E. coli*. Según lo reportado por el Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia y el uso a los Antimicrobianos (GLASS) la tasa de resistencia a ciprofloxacina en *E. coli* varió del 8,4% al 92,9% en 33 países demostrando así su ineficacia en el tratamiento de pacientes con infecciones urinarias (GLASS, 2020).

En mayor porcentaje, los aislados de *P. mirabilis* presentaban sensibilidad a los antibióticos más comunes. Sin embargo, estudios recientes han reportado un mayor porcentaje de presencia de genes capaces de conferir resistencia a distintas clases de antibióticos (Mirzaei, Nasr, Raz, Ghanadian, y Moghim, 2021). Adicionalmente se ha reportado un incremento en la producción de distintas clases de BLEE en *P. mirabilis* indicando mayor preocupación en cuanto a la MDR (Chen, Lai, Wu y Wu, 2017). El fenotipo salvaje de *P. mirabilis* es susceptible a todos los betalactámicos debido a que no es capaz de codificar cromosómicamente ninguna enzima tipo betalactamasa por lo que la forma más común de adquirir resistencia es mediante la transferencia horizontal de genes (Girlich, Bonnin, Dortet y Naas, 2020). Los resultados fenotípicos en este estudio destacan un total de 5/18 (27,8%) aislados de *P. mirabilis* como productores de BLEE. No obstante, en los resultados genotípicos (PCR) se evidenció que 6/18 (33,3%) de los aislados eran portadores de genes betalactámicos, siendo *bla*<sub>CTX-M</sub> el gen con mayor prevalencia. La comparación de resultados (fenotípicos y genotípicos) permite observar las discrepancias que existen entre ambas metodologías a la hora de determinar a un aislado como productor de BLEE o carbapenemasas. De modo que la presencia de uno o más genes en un

aislado, no necesariamente concuerdan con los resultados a nivel fenotípico (Aklilu et al., 2022).

El único aislado no identificado como BLEE de forma fenotípica, pero que presentó genes betalactámicos (*bla<sub>CTX-M</sub>* y *bla<sub>TEM</sub>*), curiosamente fue también el único aislado Gram-negativo con resistencia a ampicilina. La resistencia a ampicilina en *P. mirabilis* está asociada a la adquisición de piezas genéticas externas como plásmidos y/o transposones conjugativos. Regularmente las enzimas plasmídicas más frecuentes en enterobacterias son TEM-1, TEM-2, SHV-1 y OXA-1. La presencia de estas enzimas permite hidrolizar fármacos como la ampicilina dependiendo de su nivel de expresión (producción a bajo nivel o hiperproducción) (Noguchi et al., 2019; Aliaga, 2001).

En tanto, los resultados relacionados con la resistencia a colistina en de *P. mirabilis* 18/18 (100%) de los aislados presentaron resistencia intrínseca al fármaco a nivel fenotípico. Por otra parte, los análisis genotípicos realizados mediante amplificación de genes por PCR, no se destacó la presencia de genes *mcr* y sus variantes. Dado que *P. mirabilis* presenta resistencia intrínseca a colistina, se esperaría total ausencia de genes que confieran resistencia. Sin embargo, la resistencia intrínseca, no limita a que la bacteria pueda ser portadora de genes de resistencia *mcr* y que estos puedan ser transferidos de forma horizontal a otros organismos como *E. coli*. Esta característica de transmisibilidad hace que la bacteria se vuelva un trasmisor invisible para patógenos que presentan sensibilidad a colistina. En el estudio de Hmede y Kassem (2019), se reportó la presencia del gen *mcr-1* en un aislado de *P. mirabilis* transmitido por plásmidos en un niño libanés de 2 años (Zurfuh et al., 2016). Este resultado clave para comprender que pese a ser intrínsecamente resistente a colistina, *P. mirabilis* también puede ser portador y reservorio de genes asociado a la resistencia a colistina.

Los índices porcentuales de resistencia antibiótica en el género *Proteus* son cada vez más altos y considerando que la producción de BLEE va en aumento, se estima que con el tiempo la MDR en este género ascienda a una escala cada vez mayor (Endimiani et al., 2005; Girlich et al., 2020; Huang et al., 2015). En Ecuador los

reportes sobre producción de BLEE en *P. mirabilis* generalmente se asocian a estudios en entornos hospitalarios (Sabando, 2016). Es necesario incluir a *P. mirabilis* en estudios de caracterización fenotípica y genotípica en cuanto a la resistencia a colistina y especialmente cuando este factor está asociado a resistencia en otra clase de antibióticos como betalactámicos y carbapenémicos.

Los 11 aislados identificados como *E. coli* presentaron sensibilidad a ampicilina, siendo el antibiótico con mayor eficacia contra 28/30 (93,3%) de los aislados. *E. coli* es portador intrínseco del gen *bla*<sub>AmpC</sub> cromosómico el cual se encuentra expresado en niveles relativamente débiles debido a la presencia de un promotor atenuante. Bajo estas condiciones se impide la resistencia a betalactámicos, no obstante, la expresión del gen *bla*<sub>AmpC</sub> puede verse incrementada debido a mutaciones en la región estructural, promotora o en el atenuador además de la inserción de elementos móviles, promoviendo una hiperproducción de *bla*<sub>AmpC</sub>. Esta hiperproducción da paso a genes que confieren resistencia a betalactámicos como aminopenicilinas cefalosporinas o inhibidores de betalactamasas (Jaurin, Grundström y Normark, 1982; Tracz et al., 2005; Yu, Bing y Zhenhua, 2009).

Los patrones de resistencia a CTG en *E. coli*, presentan distintos perfiles de resistencia y solamente 2/11 (18,2%) son sensibles a las tres variantes antibióticas de CTG (ceftriaxona, cefotaxima y ceftazidima). Los perfiles de sensibilidad antibiótica coinciden con los aislados identificados como productores de BLEE (9/11). En particular, cabe destacar que la resistencia a CTG en *E. coli*, generalmente está asociada a la codificación de genes *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub> (Adator et al., 2020). De este modo, también se encontró que los aislados presentaron genes betalactámicos en 10/11 (90,9%) existiendo una alta correlación entre la detección de producción de BLEE de forma fenotípica y genotípica. De los aislados identificados como no productores de BLEE fenotípicamente (2/11), uno presentó el gen *bla*<sub>TEM</sub>, por lo tanto, se asume las discrepancias al comparar los resultados fenotípicos y genotípicos en cuanto a la producción de BLEE (Aklilu, Harun y Singh, 2022).

La presencia de genes que confieren resistencia a betalactámicos en *E. coli*, han sido ampliamente estudiados a lo largo del tiempo, siendo así que las enzimas

betalactámicas más estudiadas son las de tipo CTX-M debido a su prevalencia entre las bacterias de todo el mundo. Hasta 2018 se reportaron 180 variantes alélicas organizadas en 5 grupos por sus porcentajes de similitud de secuencias (Ghiglione et al., 2018). Bastidas-Caldes y colaboradores (2022b) realizaron una revisión sistemática sobre producción de BLEE en *E. coli* incluyendo un total de 130 artículos. De estos estudios, 65 (50%) fueron realizados en Brasil y el 50% restante fue cubierto por Argentina y Ecuador con un 11,5% cada uno, siendo Ecuador el segundo país con mayor aporte de estudios sobre BLEE en la región. En el mismo estudio se reportó que las enzimas de tipo CTX-M son las más prevalentes con un 89,4% por sobre las demás enzimas betalactámicas.

En Ecuador se reporta que la tasa de resistencia a ertapenem es relativamente baja debido a que los carbapenémicos se utilizan ocasionalmente en medicina veterinaria. Además, se excluye su uso en la industria avícola lo que indica una baja presión selectiva y por ende una baja tasa de prevalencia de aislados resistentes (Köck et al., 2018). Los datos indicados coinciden con la baja tasa de resistencia a carbapenémicos detectada en este estudio, pues solamente uno de los aislados de *E. coli* presentó un perfil de resistencia a ertapenem y meropenem. En el estudio realizado por Vinueza-Burgos, Ortega-Paredes, Narváez, De Zutter y Zurita (2019), se detectó un único aislado (1/176) con resistencia a ertapenem, de este modo los datos se correlacionan con el único aislado detectado como resistente.

La resistencia a colistina en *E. coli* actualmente se centra en el estudio de genes transmitidos a través de plásmidos. Varios de estos, se enfocan en la detección y reporte de genes tipo *mcr* junto con sus variantes alélicas. En Ecuador regularmente los reportes relacionados a resistencia a colistina, incluye la presencia de genes *mcr-1* (Calero-Cáceres et al., 2022; Montero, Irazabal, Cardenas, Graham y Trueba, 2021; Ortega-Paredes et al., 2020; Vinueza-Burgos et al., 2019). No obstante, también se ha reportado varios mecanismos moleculares en géneros como *Salmonella*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella* (Poirel et al., 2017; Olaitan, Morand y Rolain, 2014). A pesar de que no se tiene claro cómo funcionan todos estos mecanismos, se conoce que el más común es el de la alteración del LPS por regulación catiónica, similar al mecanismo de resistencia que ocurre en especies intrínsecas (Poirel et al.,

2017). Los dos aislados de *E. coli* reportados en el presente estudio como resistentes a colistina fenotípicamente, no presentaron genes de resistencia *mcr* (*mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* y *mcr-5*) y se descarta hasta el momento su presencia. Considerando que, la resistencia a polimixinas en *E. coli* se ha reportado también a nivel cromosómico y descartando la presencia de genes tipo *mcr*, se podría considerar a nuestros aislados como “resistentes cromosómicos”. No obstante, es importante realizar estudios más profundos para poder confirmar dicho mecanismo. Este mecanismo de resistencia asociado a nivel cromosómico en *E. coli* implica un alto nivel de preocupación considerando que la resistencia a colistina no solo depende de la transmisión horizontal de plásmidos y genes. La resistencia a colistina asociada a cromosomas implica la generación y proliferación de colonias bacterianas producidas a través de fisión binaria. Pese a que este tipo de resistencia a colistina es poco común en relación con la resistencia plasmídica es importante considerar e implementar estudios que se enfoquen en estudiar genes que actúan a nivel de la membrana externa especialmente en aislados de *E. coli* como lo recomienda Poirel y colaboradores (2017).

Mediante MLST se pudo constatar que la secuencia tipo (ST) reportada como ST3856 forma parte de una amplia investigación epidemiológica en Vietnam. La ST generalmente está asociadas a la diseminación de plásmidos portadores del gen *mcr-1* en aislados obtenidos de animales de granjas, trabajadores y carnes destinadas al consumo humano (Nguyen et al., 2022). Otro reporte realizado en China destaca una alta prevalencia de cepas *E. coli* resistentes a colistina, hallándose un aislado positivo para *mcr-1* (Cheng et al., 2021). Otro estudio realizado en Omaha, Estados Unidos, se centra en el estudio sobre enzimas de tipo CTX-M en aislados obtenidos a partir de muestras de orina (Geyer, 2016). De este modo se puede evidenciar una alta diseminación de cepas portadoras y no portadoras de genes de tipo *mcr-1*.

El aislado identificado como ST1589 se caracteriza por presentar una amplia diseminación y se reporta su presencia en países como República Checa (Kubelová et al., 2021; Gelbíčová et al., 2019) y China (Cheng et al., 2021). ST1589 ha sido reportada como resistente a colistina mediada por el gen *mcr-1*. Los aislados generalmente se obtiene de muestras fecales y productos cárnicos destinados para el

consumo humano provenientes de animales porcinos y aves. Esta ST muestra una alta prevalencia de resistencia a colistina comprobada mediante análisis de genoma completo (WGS), amplificación mediante PCR y secuenciación Sanger. Además, según la base de datos Enterobase, también existen reportes de ST1589 en aislados de *E. coli* obtenida a través de muestras de ganado en granjas de Brasil, [https://enterobase.warwick.ac.uk/warwick\\_mlst\\_legacy](https://enterobase.warwick.ac.uk/warwick_mlst_legacy). En cuanto a la ST624, Castellanos y colaboradores (2017), reportaron la secuencia tipo en productos de la cadena avícola colombiana detectando genes tipo BLEE/AmpC. A nivel global existe una alta prevalencia de la ST mayormente reportada en aislados de origen avícola y con cepas resistentes a antibióticos (Foster-Nyarko et al., 2021). En Países Bajos se registran aislados resistentes a colistina con presencia de genes *mcr-1.1* en 33/34 (97.1%) aislados, siendo ST624 la secuencia más común (Jamin et al., 2021). Por otro lado, la ST90 se ha reportado en 1/31 (3,2%) estudios realizados a nivel regional en América del Sur en una revisión sistemática realizada por Bastidas-Caldes (2022b). En el mismo estudio se reporta la producción de CTX-M-15 en dos aislados con MDR tomados a partir de muestras de ganado bovino en una granja comercial de Brasil. Ambos aislados identificados como ST90 eran portadores de genes resistentes a aminoglucósidos, betalactámicos, macrólidos, entre otras clases de antibióticos. Los datos coinciden con varios reportes que indican la amplia diseminación de aislados identificados con esta ST en donde generalmente existen la presencia de genes que inducen a la producción de betalactamasas y carbapenemasas (Markovska et al., 2022; Taggar, Attiq Rheman, Boerlin y Diarra, 2020). Finalmente existe un amplio número de reportes sobre ST101, relacionados mayormente a estudios de muestras tomadas a partir de aves de corral, carnes y productos avícolas como huevos. Países europeos como; Italia, Francia, Países Bajos, España, etc. destacan la presencia de genes de tipo *mcr-1* en simultáneo con genes betalactámicos (Anyanwu et al., 2021; El Garch, de Jong, Bertrand, Hocquet y Sauget, 2018). Adicionalmente, se registra la relación existente entre la ST101 de *E. coli* con la presencia de genes *mcr* en cuatro de los seis continentes (Asia, América, Europa y Oceanía), siendo Brasil el primer país americano en reportar dicha relación (Dadashi et al., 2022).

La tipificación de secuencias permitió describir cuatro ST que aún no han sido registradas en la base de datos de PubMLST (Tabla 10) por lo que el trabajo requiere

de continuidad para realizar un nuevo secuenciamiento y un análisis con más profundidad. Además de lo ya mencionado, el análisis de los aislados de *E. coli* resistente a colistina requiere de una metodología con mayor profundidad para confirmar el tipo de resistencia (cromosómica o plasmídica). Se recomienda el análisis WSG (por sus siglas en inglés, Whole Genome Sequencing) ya que en varios de los estudios consultados consideran como una técnica de mayor confiabilidad alineada a metodologías de última generación.

Como se puede evidenciar en este estudio, el perfil de resistencia de varios de los aislados es relativamente alto llegándose a considerar a varios de ellos como MDR. Los aislados de *P. mirabilis* cuentan con resistencia intrínseca a varios antibióticos, sin embargo, no se descarta la posibilidad de ser portadores de genes transmisibles asociados a transferencia horizontal. Es importante incluir a *P. mirabilis* dentro de los estudios epidemiológicos locales debido a que las investigaciones en contexto, no se basan en aislados de *P. mirabilis* obtenidos a partir de muestras tomadas de animales de granja. Además, es necesario mantener el control de la prescripción antibiótica para uso en animales, especialmente en animales destinados al consumo humano.

Si bien la tasa de prescripción antibiótica en el sector veterinario dentro del país es relativamente baja, es importante mantener un estándar de baja prescripción antibiótica, concientizando al personal asociado a la salud animal y a personas vinculadas al cuidado, mantenimiento y administración de establecimientos de crianza animal (comerciales o domésticos). Concientizar, sobre todo, acerca de la relevancia que tiene la resistencia a antibióticos y como esta se correlaciona con nuestra calidad de vida y el entorno donde vivimos.

## 7. CONCLUSIONES

1. Se concluye que dentro de la población estudiada existen distintos perfiles de resistencia a nivel fenotípico y genotípico, destacando principalmente la resistencia intrínseca a colistina y la presencia de genes relacionados con la producción de BLEE en aislados identificados como *P. mirabilis*.

2. A modo de conclusión, podemos afirmar que la identificación de aislados mediante pruebas bioquímicas es una técnica rápida que ayuda a identificar aislados con un buen porcentaje de confiabilidad. No obstante, distintos factores, entre ellos las modificaciones genotípicas, puede alterar la fiabilidad de los resultados identificativos por lo que es necesaria la implementación de técnicas eficaces rápidas y de alta precisión como MALDI-TOF, esto con el fin de evitar errores en la identificación.

3. En resumen, los resultados indican que la mayoría de aislados de *E. coli* reportados como productores de BLEE son sensibles a colistina, mientras que los aislados no productores de BLEE son resistentes al antibiótico. Además, la presencia de aislados resistentes a tres o más familias de antibióticos indica la presencia de aislados MDR. Estos hallazgos resaltan la importancia de la vigilancia constante de los patrones de resistencia a los antibióticos en los aislados de *E. coli*.

4. Se concluye que, los aislados de *P. mirabilis* indican un perfil MDR y son altamente resistentes a una variedad de antibióticos incluida la colistina, lo que sugiere una alarmante tendencia hacia la resistencia a antibióticos. Además, estos aislados son portadores de genes tipo BLEE, lo que amplía, aún más, la necesidad de implementar estudios con mayor profundidad en la especie y mucho más aún cuando los aislados provienen de muestras de animales destinados al consumo humano.

5. Se descarta la presencia de genes tipo *mcr* en todos los aislados y se asocia la resistencia a colistina en *P. mirabilis* como resistencia intrínseca, en *E. faecalis* y *E. coli* por posibles mutaciones en sus propios genes (resistencia de naturaleza cromosómica). No obstante, para confirmar o descartar lo mencionado, es

necesario implementar estudios posteriores enfocados en estos mecanismos de resistencia.

6. Después de analizar la correlación entre resistencia a colistina y la producción de enzimas de tipo betalactamasas y carbapenemasas, se concluye que los aislados estudiados presentan distintos tipos de resistencia asociados, entre los cuales están la resistencia natural o intrínseca, la resistencia adquirida a través plásmidos y la resistencia por naturaleza cromosómica. Estos hallazgos destacan la necesidad de seguir monitoreando la evolución de la resistencia bacteriana y aplicar medidas de control adecuadas para prevenir la diseminación de cepas resistentes.

7. El análisis MLST realizado en este estudio resultó ser una herramienta útil para caracterizar la diversidad genética y la distribución geográfica de cepas resistentes a nivel regional y global. Estos resultados podrían proporcionar información valiosa para comprender la distribución de cepas resistentes en la región y ayudar a diseñar estrategias más efectivas para combatirlas.

## 8. LITERATURA CITADA

- Adator, E. H., Narvaez-Bravo, C., Zaheer, R., Cook, S. R., Tymensen, L., Hannon, S. J., Booker, C. W., Church, D., Read, R. R., & McAllister, T. A. (2020). A One Health Comparative Assessment of Antimicrobial Resistance in Generic and Extended-Spectrum Cephalosporin-Resistant *Escherichia coli* from Beef Production, *Sewage and Clinical Settings. Microorganisms*, 8(6), 885.
- AGROCALIDAD (2019). Agrocalidad prohíbe el uso del antibiótico colistina en animales. Recuperado de: <https://www.agrocalidad.gob.ec/agrocalidad-prohibe-el-uso-del-antibiotico-colistina-en-animales/https://doi.org/10.3390/microorganisms8060885>
- Aklilu, E., Harun, A., & Singh, K. K. B. (2022). Molecular characterization of *bla*NDM, *bla*OXA-48, *mcr-1* and *bla*TEM-52 positive and concurrently carbapenem and colistin resistant and extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* in chicken in Malaysia. *BMC veterinary research*, 18(1), 190. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03292-7>
- Aklilu, E., & Raman, K. (2020). MCR-1 Gene Encoded Colistin-Resistant *Escherichia coli* in Raw Chicken Meat and Bean Sprouts in Malaysia. *International journal of microbiology*, 2020, 8853582. <https://doi.org/10.1155/2020/8853582>
- Aliaga R. (2001). Caracterización de las betalactamasas de espectro extendido y cefamicinasas en enterobacterias aisladas entre 1997 y 1999 en Barcelona. (Disertación de doctorado). Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10803/3848>
- Anyanwu, M. U., Jaja, I. F., Okpala, C. O. R., Jaja, C. I., Oguttu, J. W., Chah, K. F., & Shoyinka, V. S. (2021). Potential sources and characteristic occurrence of mobile colistin resistance (*mcr*) gene-harboring bacteria recovered from the poultry sector: a literature synthesis specific to high-income countries. *PeerJ*, 9, e11606. <https://doi.org/10.7717/peerj.11606>
- Ayukekbong, J. A., Ntemgwa, M., & Atabe, A. N. (2017). The threat of antimicrobial resistance in developing countries: causes and control strategies. *Antimicrobial*

resistance and infection control, 6, 47. <https://doi.org/10.1186/s13756-017-0208-x>

- Bacanlı, M., & Başaran, N. (2019). Importance of antibiotic residues in animal food. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 125, 462–466. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.01.033>
- Bao, D., Xu, X., Wang, Y., & Zhu, F. (2022). Emergence of a Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Co-Carrying a New *mcr-1.33* Variant and *blaNDM-5* Genes Recovered from a Urinary Tract Infection. *Infection and drug resistance*, 15, 1499–1503. <https://doi.org/10.2147/IDR.S358566>
- Bastidas-Caldes, C., de Waard, J. H., Salgado, M. S., Villacís, M. J., Coral-Almeida, M., Yamamoto, Y., & Calvopiña, M. (2022a). Worldwide Prevalence of *mcr*-mediated Colistin-Resistance *Escherichia coli* in Isolates of Clinical Samples, Healthy Humans, and Livestock-A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 11(6), 659. <https://doi.org/10.3390/pathogens11060659>
- Bastidas-Caldes, C., Romero-Alvarez, D., Valdez-Vélez, V., Morales, R. D., Montalvo-Hernández, A., Gomes-Dias, C., & Calvopiña, M. (2022b). Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *Escherichia coli* in South America: A Systematic Review with a One Health Perspective. *Infection and drug resistance*, 15, 5759–5779. <https://doi.org/10.2147/IDR.S371845>
- Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4\_ts), 493–496. Doi:10.1093/ajcp/45.4\_ts.493
- Benedict, R. G., & Langlykke, A. F. (1947). Antibiotic activity of *Bacillus polymyxa*. *Journal of bacteriology*, 54(1), 24.
- Boamah, V. E., Agyare, C., Odoi, H., & Dalsgaard, A. (2016). Practices and factors influencing the use of antibiotics in selected poultry farms in Ghana. *Journal of antimicrobial Agents*, 2(2), 2-8. Doi:10.4172/2472-1212.1000120

- Calero-Cáceres, W., Tadesse, D., Jaramillo, K., Villavicencio, X., Mero, E., Lalaleo, L., ... & Balcázar, J. L. (2022). Characterization of the genetic structure of *mcr-1* gene among *Escherichia coli* isolates recovered from surface waters and sediments from Ecuador. *Science of The Total Environment*, 806, 150566.
- Castanheira, M., Deshpande, L. M., Mendes, R. E., Canton, R., Sader, H. S., & Jones, R. N. (2019). Variations in the Occurrence of Resistance Phenotypes and Carbapenemase Genes Among *Enterobacteriaceae* Isolates in 20 Years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Open forum infectious diseases*, 6(Suppl 1), S23–S33. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy347>.
- Castellanos, L. R., Donado-Godoy, P., León, M., Clavijo, V., Arevalo, A., Bernal, J. F., Timmerman, A. J., Mevius, D. J., Wagenaar, J. A., & Hordijk, J. (2017). High Heterogeneity of *Escherichia coli* Sequence Types Harboring ESBL/AmpC Genes on Inc11 Plasmids in the Colombian Poultry Chain. *PloS one*, 12(1), e0170777. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170777>
- Cannatelli, A., D'Andrea, M. M., Giani, T., Di Pilato, V., Arena, F., Ambretti, S., Gaibani, P., & Rossolini, G. M. (2013). In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB regulator. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(11), 5521–5526. <https://doi.org/10.1128/AAC.01480-13>
- Chen, C. M., Lai, C. H., Wu, H. J., & Wu, L. T. (2017). Genetic characteristic of class 1 integrons in *Proteus mirabilis* isolates from urine samples. *BioMedicine*, 7(2), 9. <https://doi.org/10.1051/bmdcn/2017070202>.
- Cheng, P., Yang, Y., Cao, S., Liu, H., Li, X., Sun, J., Li, F., Ishfaq, M., & Zhang, X. (2021). Prevalence and Characteristic of Swine-Origin *mcr-1*-Positive *Escherichia coli* in Northeastern China. *Frontiers in microbiology*, 12, 712707. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.712707>
- Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) (2016). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing CLSI Supplement M100S. 26th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

- Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) (2022). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 32<sup>nd</sup> ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Dadashi, M., Sameni, F., Bostanshirin, N., Yaslianifard, S., Khosravi-Dehaghi, N., Nasiri, M. J., Goudarzi, M., Hashemi, A., & Hajikhani, B. (2022). Global prevalence and molecular epidemiology of *mcr*-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* clinical isolates: a systematic review. *Journal of global antimicrobial resistance*, 29, 444–461. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.10.022>
- Dandachi, I., Chabou, S., Daoud, Z., & Rolain, J. M. (2018). Prevalence and Emergence of Extended-Spectrum Cephalosporin-, Carbapenem- and Colistin-Resistant Gram-Negative Bacteria of Animal Origin in the Mediterranean Basin. *Frontiers in microbiology*, 9, 2299. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02299>.
- Drzewiecka D. (2016). Significance and Roles of *Proteus* spp. Bacteria in Natural Environments. *Microbial ecology*, 72(4), 741–758. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0720-6>.
- El Garch, F., de Jong, A., Bertrand, X., Hocquet, D., & Sauget, M. (2018). *Mcr-1*-like detection in commensal *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. From food-producing animals at slaughter in Europe. *Veterinary Microbiology*, 213, 42–46. Doi:10.1016/j.vetmic.2017.11.014
- El-Sayed Ahmed, M. A. E. G., Zhong, L. L., Shen, C., Yang, Y., Doi, Y., & Tian, G. B. (2020). Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000–2019). *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 868. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1754133>.
- Endimiani, A., Luzzaro, F., Brigante, G., Perilli, M., Lombardi, G., Amicosante, G., Rossolini, G. M., & Toniolo, A. (2005). *Proteus mirabilis* bloodstream infections: risk factors and treatment outcome related to the expression of extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(7), 2598–2605. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.2598-2605.2005>.

- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2016). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, 2016.
- Founou, L. L., Founou, R. C., & Essack, S. Y. (2016). Antibiotic Resistance in the Food Chain: A Developing Country-Perspective. *Frontiers in microbiology*, 7, 1881. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01881>.
- Foster-Nyarko, E., Alikhan, N. F., Ravi, A., Thomson, N. M., Jarju, S., Kwambana-Adams, B. A., Secka, A., O'Grady, J., Antonio, M., & Pallen, M. J. (2021). Genomic diversity of *Escherichia coli* isolates from backyard chickens and guinea fowl in the Gambia. *Microbial genomics*, 7(1), mgen000484. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000484>
- Fraile L. (2016). Sanidad animal y los antibióticos. Seguridad alimentaria, profilaxis, bioseguridad y comercio internacional. Recuperado de: [https://www.3tres3.com/latam/articulos/sanidad-animal-y-los-antibioticos-seguridad-alimentaria-profilaxis\\_11820/](https://www.3tres3.com/latam/articulos/sanidad-animal-y-los-antibioticos-seguridad-alimentaria-profilaxis_11820/).
- Gelbíčová, T., Baráková, A., Florianová, M., Jamborová, I., Zelendová, M., Pospíšilová, L., ... & Karpíšková, R. (2019). Dissemination and comparison of genetic determinants of mcr-mediated colistin resistance in Enterobacteriaceae via retailed raw meat products. *Frontiers in microbiology*, 10, 2824. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02824>
- Geyer, C. N., Fowler, R. C., Johnson, J. R., Johnston, B., Weissman, S. J., Hawkey, P., & Hanson, N. D. (2016). Evaluation of CTX-M steady-state mRNA, mRNA half-life and protein production in various STs of *Escherichia coli*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 71(3), 607–616. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv388>
- Ghiglione, B., Rodríguez, M. M., Curto, L., Brunetti, F., Dropa, M., Bonomo, R. A., Power, P., & Gutkind, G. (2018). Defining Substrate Specificity in the CTX-M Family: the Role of Asp240 in Ceftazidime Hydrolysis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62(6), e00116-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00116-18>

- Girlich, D., Bonnin, R. A., Dortet, L., & Naas, T. (2020). Genetics of Acquired Antibiotic Resistance Genes in *Proteus* spp. *Frontiers in microbiology*, *11*, 256. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00256>.
- Giske, C. G., & Kahlmeter, G. (2018). Colistin antimicrobial susceptibility testing-can the slow and challenging be replaced by the rapid and convenient?. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *24*(2), 93–94. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.10.007>
- Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) (2020). Report: early implementation 2020. Geneva: World Health Organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Recuperado de: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240005587>
- Gogry, F. A., Siddiqui, M. T., Sultan, I., & Haq, Q. M. R. (2021). Current Update on Intrinsic and Acquired Colistin Resistance Mechanisms in Bacteria. *Frontiers in medicine*, *8*, 677720. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.677720>.
- Hmede, Z., & Kassem, I. I. (2019). First report of the plasmid-borne colistin resistance gene (*mcr-1*) in *Proteus mirabilis* isolated from a toddler in non-clinical settings. *IDCases*, *18*, e00651. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2019.e00651>.
- Huang, C. W., Chien, J. H., Peng, R. Y., Tsai, D. J., Li, M. H., Lee, H. M., Lin, C. F., Lee, M. C., & Liao, C. T. (2015). Molecular epidemiology of CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Proteus mirabilis* isolates in Taiwan. *International journal of antimicrobial agents*, *45*(1), 84–85. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.09.004>.
- Jamin, C., Sanders, B. K., Zhou, M., Costessi, A., Duijsings, D., Kluytmans, J. A. J. W., van Alphen, L. B., & Schrauwen, E. J. A. (2021). Genetic analysis of plasmid-encoded *mcr-1* resistance in Enterobacteriaceae derived from poultry meat in the Netherlands. *JAC-antimicrobial resistance*, *3*(4), dlab156. <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab156>
- Jaurin, B., Grundström, T., & Normark, S. (1982). Sequence elements determining ampC promoter strength in *E. coli*. *The EMBO journal*, *1*(7), 875–881. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1982.tb01263.x>.

- Jolley, K. A., Bray, J. E., & Maiden, M. C. J. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome open research*, 3, 124. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
- Katip, W., Yoodee, J., Uitrakul, S., & Oberdorfer, P. (2021). Efficacy of loading dose colistin versus carbapenems for treatment of extended spectrum beta lactamase producing Enterobacteriaceae. *Scientific reports*, 11(1), 18. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78098-4>.
- Köck, R., Daniels-Haardt, I., Becker, K., Mellmann, A., Friedrich, A. W., Mevius, D., Schwarz, S., & Jurke, A. (2018). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in wildlife, food-producing, and companion animals: a systematic review. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 24(12), 1241–1250. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.04.004>.
- Kubelová, M., Koláčková, I., Gelbíčová, T., Florianová, M., Kalová, A., & Karpíšková, R. (2021). Virulence Properties of *mcr-1*-Positive *Escherichia coli* Isolated from Retail Poultry Meat. *Microorganisms*, 9(2), 308. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020308>
- Li, Z., Peng, C., Zhang, G., Shen, Y., Zhang, Y., Liu, C., Liu, M., & Wang, F. (2022). Prevalence and characteristics of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* from broiler farms in Shandong Province, China. *Poultry science*, 101(4), 101710. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101710>.
- Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L. F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J. H., & Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2), 161–168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7).
- Loest, D., Uhlend, F. C., Young, K. M., Li, X. Z., Mulvey, M. R., Reid-Smith, R., Sherk, L. M., & Carson, C. A. (2022). Carbapenem-resistant *Escherichia coli* from shrimp and salmon available for purchase by consumers in Canada: a risk

- profile using the Codex framework. *Epidemiology and infection*, 150, e148. <https://doi.org/10.1017/S0950268822001030>
- Macrogen (2020). DNA Order Guide; “CES – Sequencing Service”. Recuperado de: <https://dna.macrogen.com/com/comm/file/fileView.do>
- Marimuthu, K., Ng, O. T., Cherng, B. P. Z., Fong, R. K. C., Pada, S. K., De, P. P., Ooi, S. T., Smitasin, N., Thoon, K. C., Krishnan, P. U., Ang, M. L. T., Chan, D. S. G., Kwa, A. L. H., Deepak, R. N., Chan, Y. K., Chan, Y. F. Z., Huan, X., Zaw Linn, K., Tee, N. W. S., Tan, T. Y., ... CaPES Study Group (2019). Antecedent Carbapenem Exposure as a Risk Factor for Non-Carbapenemase-Producing Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63(10), e00845-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.00845-19>
- Markovska, R., Stankova, P., Stoeva, T., Murdjeva, M., Marteva-Proevska, Y., Ivanova, D., Sredkova, M., Petrova, A., Mihova, K., & Boyanova, L. (2022). Dissemination of High-Risk Clones *Enterobacteriales* among Bulgarian Fecal Carriage Isolates. *Microorganisms*, 10(11), 2144. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112144>
- Martínez, E. P., Golding, S. E., van Rosmalen, J., Vinueza-Burgos, C., Verbon, A., & van Schaik, G. (2023). Antibiotic prescription patterns and non-clinical factors influencing antibiotic use by Ecuadorian veterinarians working on cattle and poultry farms: A cross-sectional study. *Preventive Veterinary Medicine*, 213, 105858. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2023.105858>
- Mirzaei, A., Nasr Esfahani, B., Raz, A., Ghanadian, M., & Moghim, S. (2021). From the Urinary Catheter to the Prevalence of Three Classes of Integrons,  $\beta$ -Lactamase Genes, and Differences in Antimicrobial Susceptibility of *Proteus mirabilis* and Clonal Relatedness with Rep-PCR. *BioMed research international*, 2021, 9952769. <https://doi.org/10.1155/2021/9952769>.
- Moffatt, J. H., Harper, M., Harrison, P., Hale, J. D., Vinogradov, E., Seemann, T., Henry, R., Crane, B., St Michael, F., Cox, A. D., Adler, B., Nation, R. L., Li, J., & Boyce, J. D. (2010). Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrobial*

*agents and chemotherapy*, 54(12), 4971–4977.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.00834-10>

Moghnieh, R. A., Moussa, J. A., Aziz, M. A., & Matar, G. M. (2021). Phenotypic and genotypic characterisation of cephalosporin-, carbapenem- and colistin-resistant Gram-negative bacterial pathogens in Lebanon, Jordan and Iraq. *Journal of global antimicrobial resistance*, 27, 175–199.  
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.08.005>

Montero, L., Irazabal, J., Cardenas, P., Graham, J. P., & Trueba, G. (2021). Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing-*Escherichia coli* Isolated From Irrigation Waters and Produce in Ecuador. *Frontiers in microbiology*, 12, 709418.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.709418>

Muktan, B., Thapa Shrestha, U., Dhungel, B., Mishra, B. C., Shrestha, N., Adhikari, N., Banjara, M. R., Adhikari, B., Rijal, K. R., & Ghimire, P. (2020). Plasmid mediated colistin resistant *mcr-1* and co-existence of OXA-48 among *Escherichia coli* from clinical and poultry isolates: first report from Nepal. *Gut pathogens*, 12, 44.  
<https://doi.org/10.1186/s13099-020-00382-5>

Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A., ... & Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629-655.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)

Nagy, Á., Székelyhidi, R., Lakatos, E. H., & Kapcsándi, V. (2021). Review on the occurrence of the *mcr-1* gene causing colistin resistance in cow's milk and dairy products. *Heliyon*, 7(4), e06800. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06800>

Nguyen, P. T. L., Ngo, T. H. H., Tran, T. M. H., Vu, T. N. B., Le, V. T., Tran, H. A., Pham, D. T., Nguyen, H. T., Tran, D. L., Nguyen, T. P. L., Nguyen, T. T. T., Tran, N. D., Dang, D. A., Bañuls, A. L., Choisy, M., van Doorn, H. R., Suzuki, M., & Tran, H. H. (2022). Genomic epidemiological analysis of *mcr-1*-harboring *Escherichia coli* collected from livestock settings in Vietnam. *Frontiers in veterinary science*, 9, 1034610. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1034610>

- Noguchi, T., Matsumura, Y., Kanahashi, T., Tanaka, M., Tsuchido, Y., Matsumura, T., Nakano, S., Yamamoto, M., Nagao, M., & Ichiyama, S. (2019). Role of TEM-1  $\beta$ -Lactamase in the Predominance of Ampicillin-Sulbactam-Nonsusceptible *Escherichia coli* in Japan. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63(2), e02366-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.02366-18>
- Nummila, K., Kilpeläinen, I., Zähringer, U., Vaara, M., & Helander, I. M. (1995). Lipopolysaccharides of polymyxin B-resistant mutants of *Escherichia coli* are extensively substituted by 2-aminoethyl pyrophosphate and contain aminoarabinose in lipid A. *Molecular microbiology*, 16(2), 271–278. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02299.x>
- Olaitan, A. O., Morand, S., & Rolain, J. M. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in microbiology*, 5, 643. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00643>
- O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Recuperado de: <https://apo.org.au/sites/default/files/resource-files/2016-05/apo-nid63983.pdf>
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2022). La falta de innovación socavará el rendimiento de los antibióticos y los beneficios para la salud. Recuperado de: <https://www.who.int/news/item/22-06-2022-22-06-2022-lack-of-innovation-set-to-undermine-antibiotic-performance-and-health-gains>
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2017). La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Obtenido de: <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS) (2021). La resistencia antimicrobiana pone en riesgo la salud mundial. Recuperado de: <https://www.paho.org/es/noticias/3-3-2021-resistencia-antimicrobiana-pone-riesgo-salud-mundial>.
- Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS) (2022). Resistencia Antimicrobiana en Producción Animal. Recuperado

de: <https://www.paho.org/es/panaftosa/resistencia-antimicrobiana-produccion-animal>.

- Ortega-Paredes, D., Barba, P., & Zurita, J. (2016). Colistin-resistant *Escherichia coli* clinical isolate harbouring the *mcr-1* gene in Ecuador. *Epidemiology & Infection*, 144(14), 2967–2970. <https://doi.org/10.1017/S0950268816001369>.
- Ortega-Paredes, D., de Janon, S., Villavicencio, F., Ruales, K. J., De La Torre, K., Villacís, J. E., ... Vinueza-Burgos, C. (2020). Broiler Farms and Carcasses Are an Important Reservoir of Multi-Drug Resistant *Escherichia coli* in Ecuador. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. doi:10.3389/fvets.2020.547843
- Osei Sekyere, J. (2019). Mcr colistin resistance gene: a systematic review of current diagnostics and detection methods. *MicrobiologyOpen*, 8(4), 3–17. <https://doi.org/10.1002/MBO3.682>.
- Otter, J. A., Doumith, M., Davies, F., Mookerjee, S., Dyakova, E., Gilchrist, M., Brannigan, E. T., Bamford, K., Galletly, T., Donaldson, H., Aanensen, D. M., Ellington, M. J., Hill, R., Turton, J. F., Hopkins, K. L., Woodford, N., & Holmes, A. (2017). Emergence and clonal spread of colistin resistance due to multiple mutational mechanisms in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in London. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-017-12637-4>.
- Paitan, Y. (2018). Current Trends in Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 416, 181–211. [https://doi.org/10.1007/82\\_2018\\_110](https://doi.org/10.1007/82_2018_110)
- Poirel, L., Jayol, A., & Nordmann, P. (2017). Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clinical microbiology reviews*, 30(2), 557–596. <https://doi.org/10.1128/CMR.00064-16>.
- Rebelo, A. R., Bortolaia, V., Kjeldgaard, J. S., Pedersen, S. K., Leekitcharoenphon, P., Hansen, I. M., ... Hendriksen, R. S. (2018). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Eurosurveillance*, 23(6). doi:10.2807/1560-7917.es.2018.23.6.17-00672.

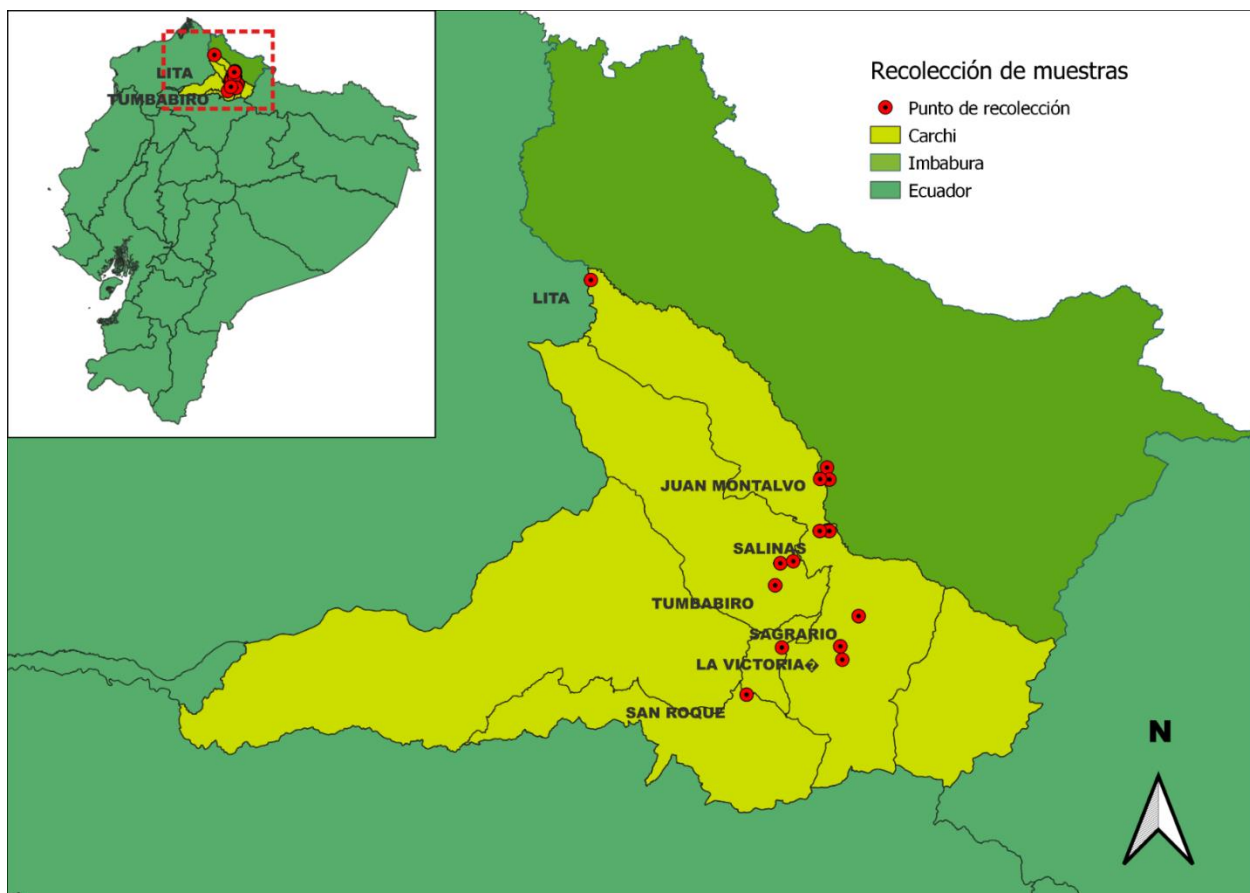
- Red de Laboratorios para la Vigilancia de Microorganismos Resistentes (RedLabRA) (2020), Tipificación bacteriana mediante Multi Locus Sequence Typing (MLST) Recuperado de: [https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/DiagnosticoMicrobiol%C3%B3gico/ProgramasVigilancia/Documents/RedLabRa-I-004-01.%20Protocolo\\_tipificacion\\_MLST.pdf](https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/DiagnosticoMicrobiol%C3%B3gico/ProgramasVigilancia/Documents/RedLabRa-I-004-01.%20Protocolo_tipificacion_MLST.pdf)
- Rodríguez-Baño, J., Gutiérrez-Gutiérrez, B., Machuca, I., & Pascual, A. (2018). Treatment of Infections Caused by Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-, AmpC-, and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Clinical microbiology reviews*, 31(2), e00079-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00079-17>
- Sabando Zambrano, D. I. (2016). Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido obtenidas de urocultivos. Elaboración de protocolo (Disertación de maestría). Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador. Recuperado de: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/46758>.
- Stefaniuk, E. M., & Tyski, S. (2019). Colistin Resistance in Enterobacteriales Strains – A Current View. *Polish Journal of Microbiology*, 68(4), 417. <https://doi.org/10.33073/PJM-2019-055>.
- Sun, J., Xu, Y., Gao, R., Lin, J., Wei, W., Srinivas, S., Li, D., Yang, R. S., Li, X. P., Liao, X. P., Liu, Y. H., & Feng, Y. (2017). Deciphering MCR-2 Colistin Resistance. *mBio*, 8(3), e00625-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00625-17>.
- Taggar, G., Attiq Rheman, M., Boerlin, P., & Diarra, M. S. (2020). Molecular Epidemiology of Carbapenemases in Enterobacteriales from Humans, Animals, Food and the Environment. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(10), 693. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9100693>
- ter Kuile, B., Kraupner, N. y Brul, S. (2016). The risk of low concentrations of antibiotics in agriculture for resistance in human health care. *Microbiology Letters*, 363(19). doi: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw210>.
- Terreni, M., Tacani, M., & Pregnolato, M. (2021). New Antibiotics for MultidrugResistant Bacterial Strains: Latest Research Developments and

- Future Perspectives. *Molecules*, 26(9).  
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES26092671>.
- Tracz, D. M., Boyd, D. A., Bryden, L., Hizon, R., Giercke, S., Van Caesele, P., & Mulvey, M. R. (2005). Increase in ampC promoter strength due to mutations and deletion of the attenuator in a clinical isolate of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* as determined by RT-PCR. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 55(5), 768–772. <https://doi.org/10.1093/jac/dki074>.
- Uddin, M. B., Alam, M. N., Hasan, M., Hossain, S. M. B., Debnath, M., Begum, R., Samad, M. A., Hoque, S. F., Chowdhury, M. S. R., Rahman, M. M., Hossain, M. M., Hassan, M. M., Lundkvist, Å., Järhult, J. D., El Zowalaty, M. E., & Ahmed, S. S. U. (2022). Molecular Detection of Colistin Resistance *mcr-1* Gene in Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Chicken. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(1), 97. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010097>.
- Van Boeckel, T. P., Gandra, S., Ashok, A., Caudron, Q., Grenfell, B. T., Levin, S. A., & Laxminarayan, R. (2014). Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet infectious diseases*, 14(8), 742-750. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70780-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70780-7).
- Vinueza-Burgos, C., Ortega-Paredes, D., Narváez, C., De Zutter, L., & Zurita, J. (2019). Characterization of cefotaxime resistant *Escherichia coli* isolated from broiler farms in Ecuador. *PloS one*, 14(4), e0207567. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207567>
- Walsh, T. R., & Wu, Y. (2016). China bans colistin as a feed additive for animals. *The Lancet. Infectious diseases*, 16(10), 1102–1103. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30329-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30329-2).
- Wang, C., Feng, Y., Liu, L., Wei, L., Kang, M., & Zong, Z. (2020). Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 508–516. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.173223>
- World Health Organization & WHO Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (WHO y AGISAR) (2017). Critically important antimicrobials for human medicine: ranking of antimicrobial agents for risk

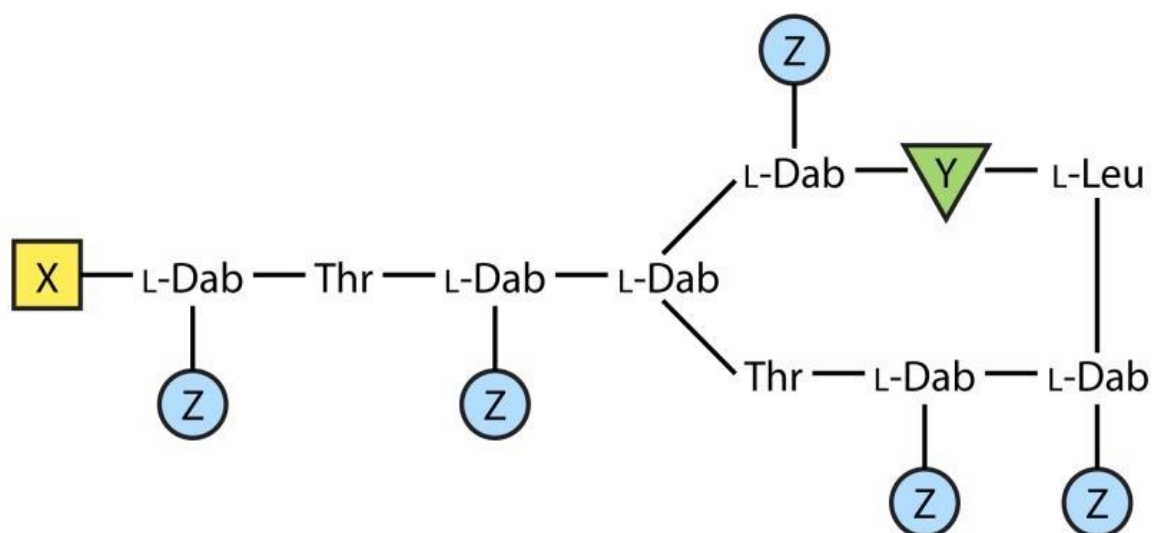
management of antimicrobial resistance due to non-human use, 5th rev. World Health Organization. Recuperado de: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/255027>.

- Yu, W., Bing, L., & Zhenhua, L. (2009). AmpC promoter and attenuator mutations affect function of three *Escherichia coli* strains. *Current microbiology*, 59(3), 244–247. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9426-7>
- Zhao, Q., Li, Y., Tian, Y., Shen, Y., Wang, S., & Zhang, Y. (2022). Clinical impact of colistin banning in food animal on mcr-1-positive Enterobacteriaceae in patients from Beijing, China, 2009–2019: a long-term longitudinal observational study. *Frontiers in Microbiology*, 13, 66.
- Zong, Z., Feng, Y., & McNally, A. (2021). Carbapenem and Colistin Resistance in Enterobacter: Determinants and Clones. *Trends in microbiology*, 29(6), 473–476. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.12.009>
- Zurfuh, K., Poirel, L., Nordmann, P., Nüesch-Inderbilen, M., Hächler, H., & Stephan, R. (2016). Occurrence of the Plasmid-Borne *mcr-1* Colistin Resistance Gene in Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in River Water and Imported Vegetable Samples in Switzerland. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(4), 2594–2595. <https://doi.org/10.1128/AAC.00066-16>

## 9. ANEXOS

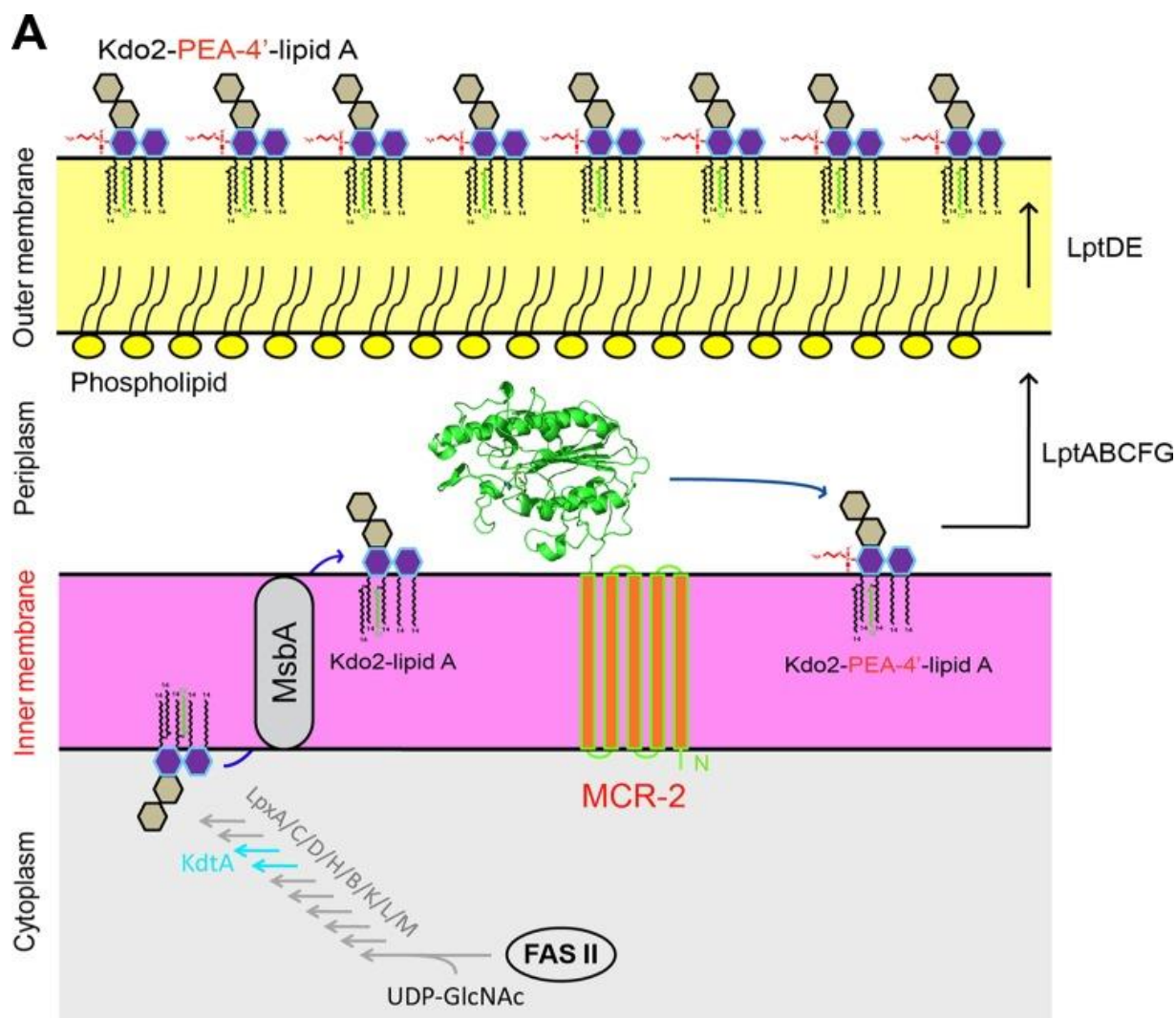


**Anexo 1 Puntos de recolección de muestras ubicados mediante datos de coordenadas geográficas en la provincia de Imbabura.** Tumbabiro (n=5); Salinas (n=9); Sagrario (n=4); San Roque (n=2); La Victoria (n=2); Lita (n=1); Juan Montalvo (n=2); Caranqui (n=1); S/D (n=4).

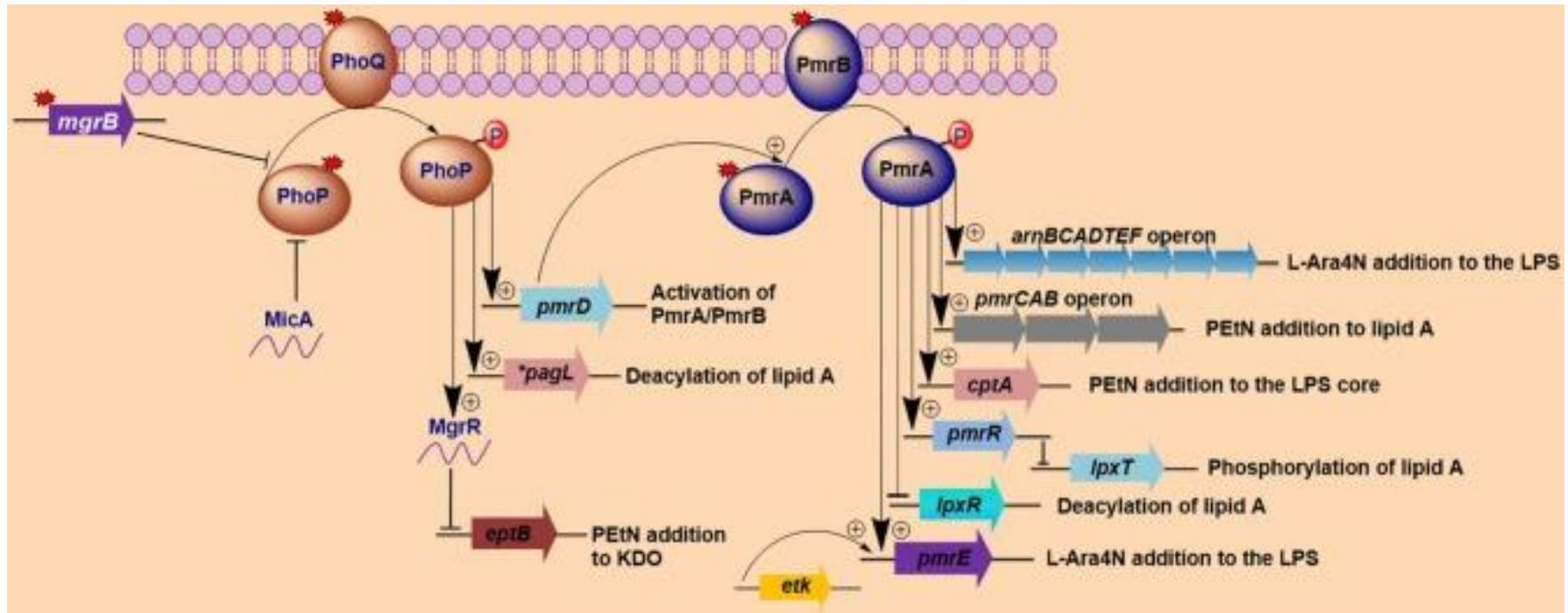


**Anexo 2 Conformación estructural adaptado para colistina.**

Figura obtenida de: Poirel, Jayol y Nordmann, 2017)



**Anexo 3 Representación esquemática sobre el mecanismo metabólico de la resistencia a la colistina mediada por MCR-2 en relación con la modificación del lipopolisacárido. Figura obtenida de (Sun et al., 2017).**



**Anexo 4 Genes reguladores implicados en la regulación del lipopolisacárido relacionado con la resistencia a polimixinas en enterobacterias.** Figura recuperada de: (Olaitan et al., 2014).

## Anexo 5 Resumen general de los resultados obtenidos en el estudio

CEPAS	ANTIBIÓTICOS (R o I)	GENES PRESENTES	PRODUCTOR DE BLEE FENOTÍPICAMENTE	RESISTENTE A COLISTINA POR ELUCIÓN EN CALDO	SECUENCIA TIPO
CB-QCA 5044	CIP, AM, CRO, CAZ	<i>bla</i> <sub>CTXM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<b>BLEE</b>	S	S/D
CB-QCA 5047	CIP, AM, CAZ, CTX	<i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<b>BLEE</b>	S	ST1589
CB-QCA 5052	CIP, AM, CRO, CTX	<i>bla</i> <sub>CTXM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<b>BLEE</b>	S	S/D
CB-QCA 5054	CIP, AM, CRO, CTX	<i>bla</i> <sub>CTXM</sub>	<b>BLEE</b>	S	ST624
CB-QCA 5062	CIP, AM, CRO, CAZ, CTX	<i>bla</i> <sub>CTXM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<b>BLEE</b>	S	S/D
CB-QCA 5063	CIP, AM, CRO, CAZ, CTX	<i>bla</i> <sub>CTXM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<b>BLEE</b>	S	ST90
CB-QCA 5067	CIP, AM, CRO, CTX	<i>bla</i> <sub>CTXM</sub>	<b>BLEE</b>	S	ST1589
CB-QCA 5134	CIP, AM, IPM, CRO, GM, CTX, COL	<i>bla</i> <sub>CTXM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<b>BLEE</b>	R	a
CB-QCA 5141	CIP, AM, IPM, CRO, GM, CTX, COL	<i>bla</i> <sub>CTXM</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<b>BLEE</b>	R	a
CB-QCA 5150	CIP, ETP, CRO, CAZ, AN, COL	a	a	R	a
CB-QCA 5152	CIP, IPM, COL	a	a	R	a
CB-QCA 5157	CIP, IPM, COL	a	a	R	a
CB-QCA 5162	CIP, AM, IPM, CRO, GM, CTX, COL	<i>bla</i> <sub>CTXM</sub> <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<b>BLEE</b>	R	a
CB-QCA 5163	CIP, AM, CRO, GM, CTX, COL	<i>bla</i> <sub>CTXM</sub> <i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<b>BLEE</b>	R	a
CB-QCA 5179	CIP, IPM, AN	<i>bla</i> <sub>CTXM</sub> <i>bla</i> <sub>TEM</sub>	a	S	a
CB-QCA 5183	CIP, AM, CRO, CAZ, CTX	<i>bla</i> <sub>CTXM</sub> <i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<b>BLEE</b>	S	S/D
CB-QCA 5196	CIP, COL	a	a	R	a
CB-QCA 5197	CIP, AM, IPM, CRO, GM, CAZ, CTX, COL	<i>bla</i> <sub>CTXM</sub> <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<b>BLEE</b>	R	a
CB-QCA 5201	CIP, COL	a	a	R	a
CB-QCA 5203	CIP, IPM, COL	a	a	R	a
CB-QCA 5208	CIP, COL	a	a	R	a
CB-QCA 5214	CIP, IPM, COL	a	a	R	a
CB-QCA 5215	CIP, COL	a	a	R	a
CB-QCA 5271	CIP, COL	a	a	R	a
CB-QCA 5304	CIP, AM, ETP, MEM, COL	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	a	R	ST3856
CB-QCA 5350	CIP, COL	a	a	R	a
CB-QCA 5376	IPM, COL	a	a	R	a
CB-QCA 5381	CIP, IPM, COL	a	a	R	a
CB-QCA 5469	CIP, AM, CRO, GM, CTX	<i>bla</i> <sub>CTXM</sub>	<b>BLEE</b>	S	ST101
CB-QCA 5475	IPM, COL	a	a	R	ST3596

CB-QCA, Colección Bacteriana Quito Católica; Meropenem (MEM); Ciprofloxacina (CIP); Amikacina (AM); Ertapenem (ETP); Imipenem (IPM); Ceftriaxona (CRO); Gentamicina (GM); Ceftazidima (CAZ); Ampicilina (AN); Cefotaxima (CTX); BLEE, betalactamasas de espectro extendido; R, resistente; S, sensible; ST, secuencia tipo; S/D, sin definir; a, ausente