PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE MEDICINA

CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE BIOQUÍMICO CLÍNICO

TÍTULO

" Determinación del gen *mcr* y sus variantes en aislados de *Escherichia coli* provenientes de muestras fecales captadas en el Centro de Salud tipo C de Guamaní de la ciudad de Quito en el año 2018."

Por: KENNY ALEJANDRO DE LA TORRE SÁNCHEZ

Director: Mtr. JOSÉ EDUARDO VILLACIS ACUÑA.

QUITO, 2019

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, **Kenny Alejandro De La Torre Sánchez, C.I. 171816675-2**; autor del trabajo de graduación intitulado: "**Determinación del gen *mcr* y sus variantes en aislados de *Escherichia coli* provenientes de muestras fecales captadas en el Centro de Salud tipo C de Guamaní de la ciudad de Quito en el año 2018**", previa a la obtención del grado académico de **BIOQUÍMICO CLÍNICO** en la **Facultad de Medicina-Carrera de Bioquímica**:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.



Kenny Alejandro De La Torre Sánchez

C.I. 171816675-2

CERTIFICACIÓN

Certifico que la disertación de Bioquímico Clínico del Sr. Kenny Alejandro De La Torre Sánchez sobre el tema "**Determinación del gen *mcr* y sus variantes en aislados de *Escherichia coli* provenientes de muestras fecales captadas en el Centro de Salud tipo C de Guamaní de la ciudad de Quito en el año 2018.**" ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas, por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



Mtr. José Eduardo Villacís Acuña

Director

Quito, 2019

DEDICATORIA

Con mucho cariño,

A mis padres Fabiola y Ronny por su apoyo incondicional, y por ser la clave para mi logro, y llevarme a ser la persona que soy.

A mi familia por ser un ejemplo de disciplina y esfuerzo, lo que he reflejado en mi vida.

A mis amigos, por cada paso que dimos juntos en la vida y seguiremos compartiendo.

¡Muchas gracias a ustedes!

Kenny De La Torre S.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por permitirme culminar esta etapa de mi vida de una manera satisfactoria. A mi familia por su cariño y preocupación en cada momento de mi vida.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Medicina, Carrera de Bioquímica Clínica y sus maestros por las enseñanzas y los conocimientos brindados, incluso como amigos a lo largo de mi formación profesional.

Agradezco a mi director de tesis, Mtr. José Eduardo Villacis por darme la confianza y guiarme en alcanzar mis objetivos, por apoyarme y darme alientos para culminar este trabajo.

Al INSPI – Quito donde desarrollé este trabajo que me permitió hacer grandes amistades, Xavier, Ruth, Carolina, Karla, Viviana, Rafael y especialmente a Katherine Jaramillo, por ser una excelente compañera y apoyarme en cada momento de esta tesis compartiendo su conocimiento y no dejándome dar por vencer.

A mi compañera y gran amiga, Adriana Endara quien supo apoyarme durante toda mi carrera con mucho aliento para seguir adelante y con buenos consejos para alcanzar este objetivo.

Kenny De La Torre S.

RESUMEN

La resistencia al colistín, mediada por mutaciones cromosómicas y por genes *mcr* transmitidos por plásmidos, se han informado cada vez más en aislamientos bacterianos tomados de humanos, animales de granjas, alimentos y medio ambiente. Esto ha generado preocupación sobre su posible transmisión horizontal entre bacterias patógenas en alimentos a humanos. Aunque se conoce una propagación mundial de bacterias resistentes al colistín, no se conoce el estado preciso de esta diseminación en nuestro país. Por lo tanto, este estudio tuvo como objetivo principal determinar la prevalencia del gen *mcr* y sus variantes en cepas de *Escherichia coli* resistentes al colistín de muestras fecales de pacientes con un cuadro presuntivo de gastroenteritis que asistieron a un centro de salud de tipo C de la ciudad de Quito por el método de PCR y secuenciación. **Metodología:** En este estudio, se examinaron 150 muestras fecales en el periodo de enero a agosto del 2018, el análisis microbiológico de las colonias aisladas se realizó mediante pruebas bioquímicas. El perfil de susceptibilidad se determinó mediante microdilución en caldo con el equipo automático Sensititre, además se identificaron los genes *mcr-1, mcr-2 mcr-3, mcr-4* y *mcr-5* mediante PCR convencional y se determinó la coexistencia de estos con el gen CTX-M mediante PCR y secuenciación. **Resultados:** De 150 muestras analizadas, fueron detectados doce aislamientos positivos para *Escherichia coli* con el gen *mcr-1,* dando una prevalencia del 8%. Dos de estas muestras presentaban además el gen CTX-M 15. Los resultados de las pruebas de susceptibilidad mostraron que la mayoría de los aislamientos positivos para *mcr-1* (83%) fueron resistentes al colistín con una CIM > 4 mg/l; sin embargo, se observó que el (16%) tuvo susceptibilidad al colistín con una CIM ≤ 0.25mg/l. **Conclusión:** Los resultados obtenidos en este estudio demuestran una clara presencia del gen *mcr-1* en pacientes de la comunidad que asisten a este centro de salud. Además, se evidencia la importancia de la detección molecular del gen

mcr, debido a que la terapia con colistín podría fallar como tratamiento de última línea contra infecciones bacterianas resistentes a múltiples antibióticos.

Palabras clave: *mcr*, *Escherichia coli*, colistín, plásmido, resistencia antibiótica, CTX-M.

ABSTRACT

Colistin resistance, mediated by chromosomal mutations and plasmid-transmitted *mcr* genes, has been increasingly reported in bacterial isolates taken from humans, farm animals, food and the environment. This has raised concerns about its possible horizontal transmission between pathogenic bacteria in food to humans. Although a worldwide spread of colistin-resistant bacteria is known, the precise state of this spread in our country is unknown. Therefore, this study had as main objective to determine the prevalence of the *mcr* gene and its variants in colistin-resistant strains of *Escherichia coli* from patients with presumptive of gastroenteritis who attended a type C health center of the Quito city by the PCR and sequencing method. **Methodology:** In this study, 150 fecal samples were examined in the period from January to August 2018, the microbiological analysis of the isolated colonies was performed by biochemical tests. The susceptibility profile was determined by broth microdilution with the Sensititre automatic equipment, in addition the *mcr-1, mcr-2 mcr-3, mcr-4 and mcr-5* genes were identified by conventional PCR and their coexistence was determined with the CTX-M gene by PCR and sequencing. **Results:** Of 150 analyzed samples, twelve positive isolates for *Escherichia coli* with the *mcr-1* gene were detected, giving a prevalence of 8%. Two of these samples also presented the CTX-M 15 gene. The results of susceptibility tests showed that most of the positive isolates for *mcr-1* (83%) were resistant to colistin with an MIC> 4 mg / l; however, it was observed that (16%) had susceptibility to colistin with an MIC ≤ 0.25 mg / l. **Conclusion:** The results obtained in this study demonstrate a clear presence of the *mcr-1* gene in patients in the community who attend this health center. In addition, the importance of the molecular detection of the mcr gene is evidenced, because colistin therapy could fail as a last-line treatment against bacterial infections resistant to multiple antibiotics.

Keywords: *mcr*, *Escherichia coli*, colistin, plasmid, antibiotic resistance, CTX-M.

TABLA DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN I

CERTIFICACIÓN II

DEDICATORIA III

AGRADECIMIENTO IV

RESUMEN V

ABSTRACT VII

LISTA DE FIGURAS XII

LISTA DE TABLAS XIII

LISTA DE ANEXOS XIV

LISTA DE SIGLAS XV

CAPÍTULO I 16

1.1 INTRODUCCIÓN 16

1.2 JUSTIFICACIÓN 19

1.3 OBJETIVOS 21

1.4.1 Objetivo general 21

1.4.2 Objetivos específicos 21

1.4 LIMITACIÓN DEL ESTUDIO 22

CAPÍTULO II 23

2.1 ANTECEDENTES 23

Variantes del gen *mcr* 24

2.2 MARCO TEORICO 25

2.2.1 Antecedentes 25

2.2.2 Generalidades de *Escherichia coli* 26

2.2.3 Epidemiologia 27

2.2.4 Colistín y su mecanismo de acción 27

2.2.5 Betalactámicos 28

2.2.6 Mecanismos de resistencia 29
2.2.7 Transferencia horizontal de genes 30
2.2.8 Plásmidos 31
2.2.9 Detección molecular de resistencia antibiótica 31
2.2.10 Gen *mcr* y sus variantes 32
2.2.11 Gen CTX-M 34
2.2.12 Concentración mínima inhibitoria (CIM) para colistín 35
2.2.13 Animales y colistín 36
2.3 MARCO CONCEPTUAL 37
CAPÍTULO III 38
3.1 MARCO METODOLÓGICO 38
3.1.1 Tipo de estudio 38
3.1.2 Tipo de muestreo 38
3.2 FASES METODOLOGICAS 38
3.2.1 Fase I. Solicitudes, aprobaciones y autorizaciones 38
3.2.2 Fase II. Recolección de información 39
3.2.3 Fase III. Procedimiento y análisis por laboratorio 39
3.2.4 Fase IV. Análisis Biología molecular 40
3.2.5 Fase V. Interpretación de los resultados 43
3.3 ANALISIS DE DATOS 44
Manejo posterior de las muestras y resultados del estudio 44
CAPITULO IV 45
4.1 RESULTADOS 45
4.1.1 Aislamiento e identificación de *Escherichia coli*. 45
4.1.2 Datos epidemiológicos de la población de estudio 45
4.1.3 Identificación molecular del gen *mcr* y sus variantes 46

4.1.4 Evaluación de susceptibilidad antibiótica 49
4.1.5 Análisis de secuencias. 50
4.1.6 Resultado de la encuesta 52
CAPITULO V 54
5.1 DISCUSIÓN 54
5.1.1 Prevalencia de *Escherichia coli mcr-1* 54
5.1.2 Susceptibilidad antibiótica de *Escherichia coli mcr-1* 56
5.1.3 Gen de resistencia CTX-M presente en *Escherichia coli* positivo para el gen *mcr-1* 58
5.1.4 Relaciones entre las preguntas de la encuesta y *Escherichia coli* con el gen *mcr-1* 59
5.2 CONCLUSIONES 61
5.3 RECOMENDACIONES 63
BIBLIOGRAFÍA 65
ANEXOS 89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación del número de pacientes de acuerdo al rango de edades en función del sexo. 46

Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de la amplificación de los genes *mcr-1*..48

Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de la amplificación del gen CTX-M. 48

Figura 4. Perfil de susceptibilidad antibiótica de las cepas de *Escherichia coli* mediante método MIC..... 49

Figura 5. Alineamiento de la secuencia del gen *mcr-1* y de la secuencia consenso..... 51

Figura 6. Alineamiento de la secuencia del gen CTX-M y de la secuencia consenso. 51

Figura 7. Representación de la frecuencia de resultados de la pregunta 1 de las encuestas del proyecto AGISAR-INSPI. 52

Figura 8. Representación de la frecuencia de resultados de la pregunta 7 de las encuestas del proyecto AGISAR-INSPI. 53

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de primers utilizados para la identificación del gen *mcr* y sus variantes 41

Tabla 2. Secuencia de primers utilizados para la identificación de CTX-M 42

Tabla 3. Relación entre poseer el gen *mcr-1* con el rango de edad de los pacientes. 46

Tabla 4. Relación entre poseer el gen *mcr-1* con el género de los pacientes. 47

Tabla 5. Identificación del gen *mcr-1* y CTX-M en cepas de *Escherichia coli*. La tabla detalla el código de la muestra, porcentaje de similitud por BLAST y el resultado. 50

Tabla 6. Relación de la presencia del gen *mcr-1* y poseer animales de granja o domésticos. 53

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Materiales, reactivos y equipos del laboratorio. 89

Anexo 2. Autorización por parte del INSPI-Quito 90

Anexo 3. Aprobación del CEISH INSPI LIP. 91

Anexo 4. Autorización de la Dirección Nacional de Inteligencia Para La Salud 93

Anexo 5. Consentimiento Informado Proyecto AGISAR – INSPI 96

Anexo 6. Protocolo de microbiología para la identificación de *Escherichia coli* mediante cultivo y pruebas microbiológicas. 104

Anexo 7. Control de la calidad de los medios de cultivo según los parámetros del CLSI 2017 y la norma ISO/TS11133-2 105

Anexo 8. Protocolo estandarizado de PCR convencional del laboratorio INSPI Quito - RAM. 106

Anexo 9. Componentes de la reacción de PCR para *mcr* y CTX-M. 109

Anexo 10. Condiciones para la amplificación del gen *mcr* y sus variantes y para el gen CTX-M. 111

Anexo 11. Manejo posterior de muestras y resultados del estudio. 112

Anexo 12. Protocolo de purificación de amplicones. 113

Anexo 13. Control de calidad de la PCR. 114

Anexo 14. Protocolo de eliminación de desechos biológicos. 116

LISTA DE SIGLAS

ATCC: American Type Culture Collection.

BLEE: Beta Lactamasa de Espectro Extendido.

CLSI: Clinical & Laboratory Standards Institute.

CIM: Concentración Mínima Inhibitoria.

IAAS: Infecciones asociadas a la atención en salud.

MDC: Microdilución en caldo.

***mcr*:** Mobilized colistin resistance.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PBP: (Penicilling Binding Proteins). Proteínas Fijadoras de la Penicilina.

PCR: (Polimerase Chain Reaction).Reacción en Cadena de la Polimerasa.

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

La resistencia al colistín mediada por plásmidos ha llevado a la medicina a un estado de shock, ya que a medida que el control y manejo de infecciones causadas por bacterias portadoras del gen *mcr* se han vuelto más difíciles, las opciones terapéuticas para combatirlas se limitaron (Osei J., 2018). El colistín, conocido también como polimixina E es un antibiótico utilizado como última línea para combatir bacterias Gram negativas (Yi-Yun L. et al., 2016). Su uso en humanos surgió como último recurso contra infecciones bacterianas multirresistentes como *P.aeruginosa, A. baumannii,* y también *Escherichia coli, Enterobacter spp, Klebsiella pneumoniae* entre otras (Medina et al, 2017), aunque es importante destacar que desde su reintroducción a la clínica, sigue existiendo confusión sobre su eficacia terapéutica frente a infecciones por bacterias multirresistentes debido a las diferentes fórmulas químicas por parte de las farmacéuticas, a la información desactualizada del producto y a la gran incertidumbre sobre las pruebas de sensibilidad, han llevado a un vacío en el conocimiento sobre la dosificación y su uso eficaz (Tsuji B. et al, 2019); aunque este antibiótico presenta una resistencia innata contra todos los Gram positivos aerobios, debe considerarse que hay microorganismos naturalmente resistentes al colistín como *Proteus spp, Serratia spp, Providencia spp, Stenotrophomonas maltophilia y Burkholderia spp* (MacLaren G & Spelman D, 2018). La administración de este medicamento puede ser de varias formas como intravenosa, intramuscular y por vía parental (Bruno C, 2015). En la industria de alimentos, el colistín se ha utilizado ampliamente en animales con fines terapéuticos y profilácticos, en gran parte del mundo, este antibiótico se utiliza para tratar infecciones causadas por *Enterobacteriaceae* en cerdos, vacas, pollos, cabras y ovejas, además es utilizado en gran medida como promotor del crecimiento para mejorar la

eficiencia del alimento y aumentar el peso corporal de los animales (Vivanco M, 2016). Lastimosamente el uso indiscriminado de este antibiótico ha causado que la resistencia generada por animales sea transferida a humanos dejando sin una de las opciones terapéuticas posibles a los hospitales en caso de necesitarla (Fernandes et al, 2016). Por lo tanto por su alta nefro y neurotoxicidad en humanos, se restringió su uso a animales. En el Ecuador, el colistín es usado con mayor frecuencia en las unidades de cuidados intensivos en humanos, sin embargo desde febrero del 2019, Ecuador mediante AGROCALIDAD que es la agencia encargada del control y regulación para la protección y el mejoramiento de la sanidad animal, sanidad vegetal e inocuidad alimentaria, se sumó al Plan de Acción sobre la Resistencia a los Antimicrobianos con apoyo de la OPS/OMS para prohibir todo uso del colistín en animales con el fin de preservar el antimicrobiano como terapia únicamente en humanos (MSP Ecuador, 2019).

El colistín obtuvo protagonismo a partir del hallazgo en China de una cepa de *Escherichia coli* SHP45 aislada de un cerdo la cual portaba el gen denominado *mcr-1*, que poseía un plásmido que confiere resistencia al colistín, de este gen se derivan variantes descubiertas en otras partes del mundo tanto en humanos como animales como *mcr-2, mcr-3, mcr-4, mcr-5, mcr-6, mcr-7 mcr-8 y mcr-9* (Liu Y. et al, 2016). El colistín tiene una estructura química conformada por un anillo peptídico policatiónico el cual posee hasta diez aminoácidos, este contiene un lazo en forma cíclica donde siete aminoácidos entre el grupo carboxilo de treonina del carbono terminal 10 y el grupo amino del ácido diaminobutírico de la cadena lateral en la posición 4; este lazo mediante una cadena de tres aminoácidos se une al ácido graso terminal (Tran T. et al, 2016). Esta estructura tiene como característica ser anfipática ya que posee una carga positiva sobre los residuos del ácido aminobutírico y el extremo terminal del ácido graso. Esta característica aporta la capacidad de ser soluble en la sangre y ataca las membranas de las células eucariotas y procariotas (Aguayo A. et al, 2016). El sitio

diana de acción del colistín es el lípido A del lipopolisacárido de las bacterias generando un efecto bactericida. Los genes de resistencia al colistín están mediados por plásmidos; *mcr* pertenece a la familia de enzimas fosfatoetanolamina transferasa la cual cataliza la adición entre esta enzima al péptido A, generando una afinidad débil entre el colistín y el lipopolisacárido. La proporción mundial de aislados de *mcr* es menor en origen humano que animal, lo que sugiere que este mecanismo de resistencia fue originado en animales y extendido por transferencia horizontal a humanos. (Zhang et al. J., 2018) (Wang X. et al, 2018).

El gen *mcr-1* tiene una frecuencia alta en *Enterobacterias*¸ produciendo una resistencia al colistín con valores de una concentración mínima inhibitoria (CIM) que varían entre 4 a 16 mg/dl (Terveer et al, 2017)**.** A nivel mundial se ha reportado en animales una prevalencia muy variada que oscila entre 0,02% al 20,6% en ganado, 1,5% a 19% en carne de venta y 0,08% a 2% en pacientes hospitalizados (Terveer et al, 2017)**,** esta distribución sugiere que los animales son un reservorio óptimo para la transferencia de plásmidos a seres humanos (Baquero et al., 2013)**.** Además estudios demuestran que puede existir correlación entre aislamientos positivos para β-lactamasas de espectro extendido (BLEE), como CTX-M con la coexistencia del gen *mcr-1* en un mismo clon bacteriano, los cuales son capaces de expresar y transferir *mcr* y BLEE, por lo que la expansión de estos genes puede ser subestimada (Falgenhauer et al, 2016). Hasta la actualidad se ha reportado *mcr-1, mcr-3, mcr-4, mcr-5 mcr-8* y *mcr-9* en humanos y *mcr-2, mcr-6 y mcr-7* únicamente en animales (Wang X. et al, 2018) (Rebelo et al., 2018).

Los estudios sobre portadores del gen *mcr-1* en heces de humanos en centros de salud son muy limitados, hasta el momento países asiáticos cuentan con la mayor cantidad de reportes (Terveer et al, 2017); en Latinoamérica entre los años 2000 y 2018 existen pocos reportes

de casos publicados en humanos con 18 en Brasil, 3 en Argentina, 2 en Colombia y Venezuela y entre Ecuador, Chile, Uruguay, Bolivia y Perú se han reportado 1 (Mendes V. et al., 2019). Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar la prevalencia del gen *mcr* y sus variantes, así como la coexistencia con el gen CTX-M en muestras fecales de pacientes que acuden al Centro de Salud Tipo C de Guamaní entre enero a agosto del año 2018.

1.2 JUSTIFICACIÓN

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son los patógenos más frecuentes en infecciones relacionadas al microbioma intestinal, ya que este es un reservorio normal de bacterias resistentes a antibióticos de uso en humanos, por lo tanto, sirve como transporte asintomático de bacterias productoras de los genes que provocan multirresistencias, siendo así necesario tomar medidas de prevención y control. Por esta razón, varios estudios se han enfocado en la detección de genes responsables de multirresistencias antibióticas como lo es el gen *mcr* y sus variantes *mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4, mcr-5, mcr-6, mcr-7* y *mcr-8.* En el Ecuador, solo existe un caso reportado del gen *mcr-1* en humanos, por lo tanto, la información sobre la caracterización de los genes de resistencia al colistín es muy escasa en aislados clínicos de *Escherichia coli.* De esta manera, por la importancia clínica que tienen las *Enterobacteriaceae,* especialmente *Escherichia coli* es necesario realizar el presente estudio.

El colistín pertenece a la familia de antibióticos denominada polimixinas, las cuales se han utilizado con frecuencia en el área veterinaria alrededor del mundo en la terapéutica y como promotor de crecimiento. Antes de la detección del gen *mcr,* la resistencia al colistín estaba ligada únicamente a mutaciones cromosómicas que regulaban la síntesis de la pared de las bacterias Gram negativas.

El gen *mcr* está mediado por plásmidos y tiene la función de codificar una fosfoetanolamina transferasa que altera los lipopolisacáridos de la membrana de las bacterias Gram negativas, esto reduce la unión del antibiótico evitando la lisis de la bacteria. El gen *mcr-1* ha sido descrito en su mayoría en animales de granja según un estudio realizado en China en el 2016, no obstante, se han observado varios casos de infecciones por *Enterobacteriaceae* en humanos, la prevalencia más alta en aislados clínicos de la región de las Américas se encuentra en países como Brasil, Colombia y Argentina, principalmente en muestras diarreicas con una alta frecuencia de *Escherichia coli*.

La presente investigación partió de un estudio mayor denominado Proyecto AGISAR – INSPI que investigó la "Prevalencia y resistencia antimicrobiana en *Campylobacter, Salmonella y E. coli* ESBL, en granjas avícolas, carne de aves de corral y casos de gastroenteritis en humanos de octubre 2017 a julio de 2018 en el Distrito Metropolitano de Quito."; donde se planteó analizar la prevalencia del gen *mcr* y sus variantes en muestras de heces fecales de pacientes que acudieron al Centro de Salud Tipo C de Guamaní identificando la coexistencia del gen *mcr* con el gen CTX-M para posteriormente hacer un análisis y establecer su prevalencia.

Debido a la importancia clínica que este tema merece, se evaluó la presencia del gen *mcr* y CTX-M mediante la técnica de PCR convencional y secuenciación de aislados d*e Escherichia coli* provenientes de heces fecales, resultados que pretenden evidenciar la situación actual de estos genes a nivel comunitario que se atiende en el Centro de Salud tipo C de Guamaní.

En este estudio los resultados obtenidos aportaran a la Red Integral de Salud debido a que no se cuenta con una prevalencia comunitaria de los genes *mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 y*

mcr-5; este estudio dará paso a nuevas investigaciones orientadas a la búsqueda de estos genes de resistencia en poblaciones mayores.

La investigación planteada fue viable gracias al financiamiento del proyecto AGISAR – INSPI. Además, la presente investigación contó con el equipamiento e infraestructura necesaria por parte del Centro Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) para realizar los análisis microbiológicos y moleculares.

1.3 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo general

Determinar la presencia del gen *mcr* y sus variantes presentes en *Escherichia coli* aisladas de muestras fecales de pacientes captados en el Centro de Salud Tipo C de Guamaní de Quito en el año 2018.

1.4.2 Objetivos específicos

- Determinar el perfil de susceptibilidad antimicrobiano de cepas de *Escherichia coli mcr* aisladas de las muestras fecales, mediante el método de microdilución en caldo.
- Identificar las variantes del gen *mcr* y β-lactamasas de espectro extendido CTX-M en aislamientos de *Escherichia coli* mediante reacción en cadena de la polimerasa convencional
- Determinar la coexistencia de las variantes de CTX-M en los mismos aislamientos de *Escherichia coli* mediante secuenciación.

- Determinar la relación que existe entre pacientes que presenten *Escherichia coli* portadora del gen *mcr* y variables epidemiológicas referentes a los hábitos alimenticios y la convivencia con animales domésticos y de granja.

1.4 LIMITACIÓN DEL ESTUDIO

- Pacientes que en la encuesta realizada por el proyecto AGISAR-INSPI contestaron que no consumieron carne de pollo, res o chancho 2 días previos a acudir al centro de salud y recolectar la muestra de heces fecales.
- Pacientes que en la encuesta realizada en el proyecto AGISAR-INSPI contestaron que tomaron antibióticos previos a la toma de muestra de heces fecales.

CAPÍTULO II

2.1 ANTECEDENTES

Shen et al. informó el primer hallazgo de resistencia al colistín, en aislados de pollos vivos en China en el año de 1980 sin saber que este se trataba del *gen mcr*. Posteriormente el 18 de noviembre de 2015, Liu et al. informan sobre la primera descripción de la resistencia al colistín por medio de plásmidos (gen *mcr-1)* en alimentos preparados para animales y para consumo humano en China (Liu et al., 2016; Zhangqi Shen, 2016).

Un estudio realizado entre noviembre del 2012 y noviembre del 2013, para la identificación de la prevalencia del gen *mcr-1* en heces de turistas holandeses que habían permanecido entre 8 a 40 días en distintos puntos de América del Sur; encontraron que 6 de 9 aislamientos presentaban *Escherichia coli* productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y con resistencia al colistín mediado por el gen *mcr-1* (Maris S Arcilla, 2015).

En abril del 2016, Brasil informó del primer hallazgo de *Escherichia coli* productora del gen *mcr* 1aislado de alimentos para consumo humano y animal (MR Fernandes, 2016).

En mayo del 2016 en Argentina, el Laboratorio Regional de Referencia de la Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (ReLAVRA) reporta el hallazgo de 9 cepas de *Escherichia coli* portadoras del gen *mcr-1*, de pacientes de 6 hospitales diferentes del país; los aislamientos no tenían relación genética entre sí y se detectó que la resistencia era de tipo transferible, es decir que este mecanismo es capaz de transferirse entre bacterias (Melina Rapoporta, 2016).

En el mismo año, en Colombia se detecta por primera vez enterobacterias con el gen *mcr-1* en tres aislamientos de *Salmonella* y uno de *Escherichia coli*, de pacientes de distintas zonas del país (Melina Rapoporta, 2016).

En el Ecuador, en el año 2016 se reportó por primera vez un caso de *Escherichia coli* positiva para el gen *mcr-1* en un paciente de 14 años (Ortega P. et al., 2016).

Variantes del gen *mcr*

Mientras estos hallazgos iban surgiendo, se fueron encontrando nuevas variantes del gen *mcr,* como la identificación del gen *mcr-2,* en Bélgica, de muestras porcinas y bovinas las cuales contenían el gen *mcr-1* con ciertos cambios en su secuencia, indicando que este nuevo gen tiene una fosfoetanolamina transferasa de 1617 pares de bases en un plásmido IncX4, compartiendo el 76.7% de los nucleótidos con el *mcr-1* (Xavier BB, 2016).

En agosto del 2017, se describe el primer hallazgo del gen denominado *mcr-3* extraído de una muestra de *Escherichia coli* de un hemocultivo de un paciente en Dinamarca, en un plásmido IncHI2 (Roer et al., 2017).

En ese mismo año, se identifica el nuevo gen *mcr-4* de resistencia al colistín proveniente de una cepa de *Salmonella* aislada de un cerdo sacrificado en Italia en el año 2013, así como en cepas de *Escherichia coli* extraídas de diarreas de cerdos en España y Bélgica entre el 2015 y 2016, este es mediado por un plásmido no autoconjugativo (Carattoli A, 2017).

Y finalmente en diciembre del año 2017, se identificó un nuevo gen de resistencia al colistín denominado *mcr-5* con 1644 pares de bases, localizado en el plásmido ColE, obtenido de 14 aislados de *Salmonella* que presentaban los genes *mcr-1, mcr-2 y mcr-3* (Borowiak et al., 2017).

Para el mes de junio de 2016, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) identificó por primera vez *Escherichia coli* portadora del gen *mcr-1* en una muestra humana, por otro lado el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) y el Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados

Unidos (HHS) informaron la detección de *Escherichia coli* portadora del gen *mcr-1* en las heces de un cerdo (McGann P, 2016; Smith et al., 2016).

Hasta la actualidad, no se han reportado casos de muertes causadas por microorganismos portadores del gen *mcr.* Aunque es posible ser portador asintomático de bacterias con este gen, con la probabilidad de diseminación por plásmidos o al pasar su información genética a otras bacterias más virulentas (OPS/OMS, 2016).

2.2 MARCO TEORICO

2.2.1 Antecedentes

Varias especies de *Enterobacteriaceae* multirresistentes constituyen un grave problema para la salud pública (Soto Z. et al, 2016) (Gómez O, 2014), Varios estudios reportan la presencia de resistencia al colistín codificados por genes en *Escherichia coli*. Actualmente, existen diversas variantes de estos genes como *mcr-1* (Yi-Yun L. et al., 2016) *mcr-2* (Xavier et al., 2016) *mcr-3* (Yin W et al, 2017) *mcr-4* (Carattoli A, 2017) *mcr-5* (Borowiak et al., 2017) *mcr-6* (Partridge S. et al., 2018) *mcr-7* (Yang Y. et al., 2018) *mcr-8* (Wang X. et al., 2018) y *mcr-9* (Carroll L. et al., 2019) que han sido documentadas en varias especies y género.

No obstante, a excepción de *mcr-9* todas las variantes fueron descubiertas en cerdos y aves de corral; en humanos solo se han reportado los genes *mcr-1, mcr-2, mcr-3 , mcr-4, mcr-5, mcr-8 y mcr-9* (Zhang et al., 2018) (Dalmolin T. et al., 2018). Por ejemplo, en América Latina y el Caribe las variantes del gen *mcr* más prevalentes son *mcr-1, mcr-3 y mcr-5* las cuales han sido identificadas tanto en muestras clínicas como de animales, en su mayoría caracterizadas en cepas de *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae y Salmonella entérica* serovar Typhimurium (Mendes V. et al., 2019). En el Ecuador, solo existe un reporte clínico del gen *mcr-1* de un paciente de 14 años hospitalizado en la ciudad de Quito (Ortega P. et

al., 2016). En el país, existen dos reportes de resistencia al colistín mediado por el gen *mcr-1* en animales, en cerdos y pollos de granjas de la selva amazónica y de la costa del Pacifico del Ecuador (Yamamoto Y. et al., 2019) y en heces de perros en un parque público de la ciudad de Quito (Ortega D et al., 2019). A nivel de medio ambiente en el país, hasta el momento, no existen estudios reportados relacionados a la presencia de genes de resistencia al colistín.

2.2.2 Generalidades de *Escherichia coli*

Escherichia coli es una bacteria de la familia *Enterobacteriaceae* de clase Gramnegativo esta se encuentra presente como microbiota normal del colon en seres humanos (De La Fuente et al, 2017)**.** Se trata de un bacilo móvil, oxidasa negativo, anaerobio facultativo, fermentador de lactosa cuyo crecimiento óptimo es a 37°C (Mosquito S. et al., 2011).

Este microorganismo es considerado el patógeno oportunista principal del género *Escherichia* debido a que convive normalmente en el intestino de los humanos, pero en personas con baja inmunidad causa infecciones intestinales y extraintestinales (Gomes et al, 2016) gracias a que sus cepas han evolucionado mediante adquisición, transfiriendo genes horizontalmente. *Escherichia coli* tiene un tamaño del genoma tan extenso que puede contener genes de virulencia adicionales y de características físicas distintas, esto es en gran parte, permitido por una gran colección genética flexible que posee a través de la perdida y ganancia de material genético en una serie de puntos clave en todo el genoma (Croxen et al, 2013). Estas características permiten una transferencia fácil entre genes bacterianos que se encuentran en alimentos y el ser humano (Blount et al., 2015).

2.2.3 Epidemiologia

Uno de los agentes epidemiológicos más importantes causantes de diarreas es *Escherichia coli,* especialmente en países en desarrollo donde presentan un alto índice de mortalidad y morbilidad especialmente en niños (M. Urrestarazu et al, 2009), esto se debe a que la alta contaminación de agua y productos alimentarios son fuentes principales de transmisión de *Escherichia coli,* donde se demuestra que en Sudamérica el 30% de los alimentos para consumo están contaminados por esta bacteria (Gómez, 2014).

Con respecto a microorganismos portadores del gen *mcr*, desde su descubrimiento en el Ecuador existe solo un único caso reportado en el año 2016 por (Ortega D. et al., 2016), representando junto a Chile, Paraguay y México uno de los países con menos reportes en Latinoamérica y el Caribe, con apenas el 0.2% de reportes de bacterias positivas para este gen (Mendes V. et al, 2019).

2.2.4 Colistín y su mecanismo de acción

Este antibiótico es llamado de última línea, debido a que su uso es limitado, y se incluye dentro de esquemas terapéuticos combinados, en caso de que los antibióticos comúnmente prescritos no sean eficaces o apropiados de acuerdo con la situación del paciente, ya que se conoce que produce nefrotoxicidad y neurotoxicidad en dosis mayores a las recomendadas o usos prolongados (Vidal, 2017).

Muchas bacterias del medio ambiente son resistentes al colistín, ya que este medicamento se utiliza ampliamente en la industria de alimentos con fines terapéuticos y profilácticos en animales como promotor del crecimiento en el ganado con el fin de prevenir enfermedades por *Enterobacteriaceae*. Pero en los últimos años se ha descubierto que los genes que confieren resistencia al colistín son bucles de ADN presentes en plásmidos que son

compartidos fácilmente, generando el paso de información entre distintos tipos de cepas bacterianas.

Colistín es un polipéptido con la capacidad de alterar la permeabilidad de la capa externa de lipopolisacáridos de las bacterias Gramnegativas, esto genera la muerte de la bacteria por atracción electrostática por la carga positiva de los grupos amino y el carboxilato con iones sulfato de la capa externa de las bacterias (Medina et al, 2017) provocando modificaciones de las paredes de las bacterias generando una pérdida de su contenido interno y por consecuencia un efecto bactericida (Vidal Group, 2014).

2.2.5 Betalactámicos

Los betalactámicos son antibióticos cuya principal función es evitar la síntesis de los peptidoglucanos de la pared celular de las bacterias para inducir la lisis (Baquero et al., 2013) (Rada A. et al., 2019). Las betalactamasas son enzimas con un mecanismo de acción que consta en romper un puente de amida del anillo betalactámico para inactivar el antibiótico al no permitir la unión a las proteínas ligadoras de penicilinas (PBP) de la bacteria (Vargas E. et al., 2016). Los β-lactámicos poseen estructuras similares a D-alanil-D-alanina, que es un aminoácido terminal para la síntesis de la pared peptídica (Ocampo A. et al., 2015). Estos antibióticos se unen irreversiblemente al sitio activo de las PBP lisando las bacterias (Shaikh S. et al., 2015) (Lahey Clinic, 2017). Por otro lado, los β-lactámicos son capaces también de activar una autolisina bacteriana, que es una sustancia endógena que produce la lisis del peptidoglicano en concentraciones de más de 4 y 0 veces de CIM (Miranda, 2013). Ambler clasifico en clases serin proteasas A, C y D basándose en la homología proteica y de clase dependiente de zinc B (Joaquín Gómez, 2015).

Los carbapenémicos son antibióticos en contra de bacterias Gram positivas y negativas (Vanegas J. et al., 2016) (Ocampo A. et al., 2015). Estos antibióticos tienen un anillo β-lactámico fusionado con un anillo similar al de las penicilinas, su mecanismo de acción es impedir la síntesis de la pared bacteriana e interrumpir el ensamblaje de los peptidoglicanos (Martínez P.et al., 2014) (Cuzon G. et al., 2013). Estos antibióticos son considerados de última elección, entre los más utilizados están meropenem e imipenem para el tratamiento de infecciones, principalmente por bacterias Gram negativas aerobias (Rojas L. et al., 2013) (Vargas E. et al., 2016).

Las carbapenemasas son β-lactamasas que hidrolizan β-lactámicos y carbapenémicos (Blanco G. et al., 2014) generando resistencia bacteriana. Existen varias especies bacterianas que sintetizan carbapenemasas, entre ellas se encuentran las enterobacterias donde con mayor frecuencia se ha aislado este tipo de enzimas (Zilberberg M. et al., 2017) (Daikos G. et al., 2014).

2.2.6 Mecanismos de resistencia

Los mecanismos de resistencia bacteriana pueden ser intrínsecos, naturales, adquiridos o de tipo adaptativo (OIE, 2016) (di Conza J. et al., 2014). La resistencia intrínseca se caracteriza por ser propia de la bacteria sin tener relación con la presencia del antibiótico. Este tipo de resistencia está ligada a la presencia de genes en el cromosoma bacteriano que contribuyen a la inactivación de antibióticos como fluoroquinolonas o β-lactámico (Shah M. et al., 2016). La resistencia adquirida suele ser resultado de una mutación o alteración en los genes del cromosoma bacteriano, o por la incorporación de material genético transferido horizontalmente a la bacteria (Reid C. et al., 2015).

La resistencia adaptativa confiere a la bacteria la capacidad de sobrevivir en presencia de antibióticas donde expresa sus genes de resistencia dependiendo las condiciones del medio

donde se encuentra (Ingle D. et al., 2018). Finalmente, estas resistencias pueden combinarse al expresar diferentes fenotipos (Fica A., 2014) (Laxminarayan R. & Chaudhury R., 2016).

La resistencia antibiótica de *Escherichia coli*, igual que muchas enterobacterias, puede ser intrínseca o adquirida (Miranda, 2013). Los tipos de mecanismos moleculares de resistencia antibiótica destacan por su relevancia siendo alteración del sitio blanco, alteraciones de permeabilidad e inactivación enzimática (Mosquito S. et al., 2011).

2.2.7 Transferencia horizontal de genes

Las transferencia horizontal de genes es un proceso donde la bacteria transfiere su material genético a otra, esto puede ser entre bacterias de una misma especie o entre especies distintas en un ambiente adecuado (Kintses B. et al., 2019). Este proceso es uno de los mecanismos de evolución bacteriana más importante, ya que las bacterias adquieren información genética nueva proporcionándoles ventajas selectivas, siendo este mecanismo esencial para desarrollar resistencias antibióticas (Hughes A. et al., 2016) (Cullen T. et al., 2015).

Las bacterias son capaces de transferir horizontalmente sus genes mediante diferentes procesos como la transducción, conjugación, transformación y por la incorporación de ADN mediante recombinación del sitio especifico u homólogo y por transposición (Brito I. et al., 2016). Los elementos genéticos que participan en este intercambio son principalmente plásmidos, integrones, bacteriófagos, ADN y transposones (Kaiser G., 2019).

En las bacterias, el proceso más utilizado es el mecanismo de transferencia de genes de resistencia por conjugación, proceso donde dos bacterias hacen contacto físico entre sitios específicos (Luo Q. et al., 2017). Este contacto genera la formación de un puente plasmático llamado pili, donde un plásmido pasará de una bacteria a otra. Estos procesos pueden llevarse a cabo de forma inducida por condiciones de laboratorio o natural (Burmeister A., 2015).

2.2.8 Plásmidos

Los plásmidos son fracciones de ADN extracromosomal que son transferidos de una bacteria a otra independientemente si son de la misma especie (Yang F. et al., 2019). Los elementos extracromosomales tienen una estructura de doble cadena circular de ADN, pequeña con extremos libres y se pueden replicar de forma independiente (Dimitriu T. et al., 2019). Los plásmidos pueden ser de dos tipos, los movilizables que adquieren elementos genéticos como transposones o elementos de inserción los cuales son móviles y los conjugativos que tienen la capacidad de movilizarse por sí solos (Li Q. et al, 2019). Estos dos tipos son los responsables de la alta diseminación de determinantes genéticos que confieren resistencia a las bacterias Gram negativas. Los plásmidos transportan genes clave específicos para codificar antibióticos como las polimixinas, quinolonas, β-lactámicos, cloranfenicol, macrólidos, trimetoprim, aminoglucósidos, tetraciclina o sulfonamidas (Castellanos . et al., 2017) (Knudsen P. et al., 2018).

2.2.9 Detección molecular de resistencia antibiótica

La identificación de genes de resistencia presentes en una bacteria es fácil gracias a los diferentes métodos disponibles en la actualidad (Kadri K., 2019). Entre los métodos más utilizados se encuentra la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el secuenciamiento (May M., 2019). La técnica de PCR se basa en una reacción enzimática que da como resultado la amplificación de una sección específica del ADN (Gast M. et al., 2019). Durante el proceso ocurren cambios bruscos de temperatura por ciclos, que dará origen a tres pasos primordiales que son la desnaturalización, hibridación y extensión del ADN (Russo J, 2017). En la denaturación se utiliza altas temperaturas que van de 90 a 95 °C lo cual promoverá la separación de las cadenas de ADN (Stein L, 2010). Después secuencias cortas de ADN llamadas primers, se hibridan con las cadenas de ADN separadas previamente por la

denaturación. Posterior a esto, la enzima de ADN polimerasa sintetiza nuevas cadenas de ADN a una temperatura de 72°C llamando a este proceso hibridación (May M., 2019).

En la secuenciación del ADN, se puede observar el orden de los nucleótidos de una sola secuencia, con esta información se conoce su estructura y función (Rebelo et al., 2018). El secuenciamiento puede ser de primera o de siguiente generación (Wetterstrand K, 2019), la primera generación que es el más comúnmente utilizado es de dos tipos:

- Secuenciamiento Sanger, donde se emplea nucleótidos conocidos como dideoxinucleótidos (ddNTPs) que se caracterizan ya que carecen del grupo 3 OH, impidiendo la elongación del producto a amplificar. Los ddNTPs que están marcados, se incorporan al azar generando una población con una sola base diferente de las demás. En la electroforesis estos productos migran en un gel de poliacrilamida (Mardis E, 2011).
- Secuenciamiento Maxam-Gilber, el cual es un método no enzimático (Metzker M, 2010).

2.2.10 Gen *mcr* y sus variantes

El gen *mcr-1* contiene información que codifica un mecanismo genético que confiere la resistencia al colistín, el cual fue desarrollado en la década de 1950, obtenido de la bacteria *Paenibacillus polymyxa colistinus*, para atacar a todos los bacilos Gram negativos, siendo este el primer mecanismo de transmisión relacionada con un plásmido (Gua et al., 2016).

En el año 2016, en China se notificó la aparición de un gen de resistencia al colistín mediado por plásmidos, denominado *mcr-1* (Liu Y. et al, 2016), desde entonces, se han notificado varios reportes sobre la aparición de *mcr-1* en *Enterobacteriaceae* obtenidas a partir de animales, humanos, medio ambiente y alimentos alrededor del mundo (Baron S. et al, 2016).

El gen *mcr* codifica una fosfatoetanolamina (pEtN) transferasa que modifica los lípidos A

de las bacterias, confiriendo resistencia al colistín. Un análisis *in vitro* demostró que las características de esta pEtN son muy similares a enzimas presentes en bacterias Gram negativas intrínsecamente resistentes al colistín (Hu M. et al, 2016).

El gen *mcr* fue detectado principalmente en *Escherichia coli* y en menor proporción, en bacterias como *Klebsiella pneumoniae.* Los estudios epidemiológicos sugieren que *mcr-1* se ha detectado en diez especies distintas de *Enterobacteriaceae* (Arcilla et al, 2016). Recientemente, se han informado nuevas variantes del gen *mcr, mcr-2, mcr-3, mcr-4, mcr-5, mcr-6, mcr-7 y mcr-8* (Mendes V. et al., 2019).

Curiosamente, todas estas variantes se detectaron en países distintos lo cual indica la posibilidad de una evolución constante del gen *mcr-1* mediado por alguna presión selectiva desconocida en los humanos, animales y medio ambiente (Sun J. et al, 2018).

El gen *mcr-2* se identificó por primera vez en cerdos y bovinos en Bélgica en aislados de *Escherichia coli* (Xavier et al., 2016). Después esta misma variante fue recuperada de muestras humanas en Suiza (Liassine N. et al, 2016). El análisis filogenético realizado entre *mcr-1* y *mcr-2* mostró una identidad de aminoácidos del 80.6% (Xavier et al., 2016).

El gen *mcr-3* fue descubierto por primera vez en Malasia de aislados de *Escherichia coli* de cerdos, así mismo, de una muestra clínica en Tailandia de *Klebsiella pneumoniae* y de *Salmonella* Typhimurium en los Estados Unidos (Yin W et al, 2017). El análisis que se llevó a cabo de este gen mostro que tenía una estrecha relación con pEtN de *Aeromona spp* que es intrínsecamente resistente a colistín (Quiroga C. et al, 2019).

El gen *mcr-4* se encontró en Europa procedente de *Salmonella* Typhimurium y *Escherichia coli* en humanos y animales productores de alimentos (Carattoli A, 2017). Este gen tiene una

identidad de secuencia de aminoácidos de 34% con el gen *mcr-1,* 35% con el gen *mcr-2* y 49% con el gen *mcr-3.*

El gen *mcr-5* se observó en 14 aislamientos de *Salmonella* Paratyphi B dTa + de aves de corral y alimentos en Alemania (Borowiak et al., 2017). Este gen comparte el 35% de identidad con las variantes del gen *mcr-1, mcr-2, mcr-3* y *mcr-4.*

Estos genes de resistencia al colistín se han convertido en una amenaza para la salud pública. En América Latina, la incidencia de *mcr* es baja, sin embargo, es posible observar un aumento rápido de la prevalencia de estos genes (Quiroga C. et al, 2019).

2.2.11 Gen CTX-M

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) son un tipo de mecanismo de resistencia a cefalosporinas más comunes en *Enterobacteriaceae.* Esta enzima otorga a la bacteria la capacidad de hidrolizar antibióticos donde las más relevante es de tipo CTX-M, la cual tiene actividad intrínseca siendo estas las de mayor reporte a nivel mundial, predominando en enterobacterias como *Escherichia coli* (Rivera-Jacinto et al., 2015).

Escherichia coli productora de CTX-M está asociada a infecciones comunitarias y hospitalarias (Tadesse D. et al, 2018). Informes en varios países describen la presencia de cepas bacterianas de *Escherichia coli* con el gen CTX-M en animales aparentemente sanos, en productos alimenticios de origen animal, así como en mascotas y animales de granja (Davis M. et al, 2015).

Los genes CTX-M incluyen más de 50 enzimas divididas en 5 grupos por similitud de aminoácidos, de esta manera se disponen en CTX-M 1, CTX-M 2, CTX-M 8, CTX-M 9 CTX-M 15 y CTX-M 25; la bacteria *Escherichia coli* productora de CTM-X está diseminada

entre la comunidad tanto hospitalaria como en los entornos sociales, por lo tanto es necesario prestar atención para prevenir la propagación de etas cepas (Zamani et al., 2015).

Según Quiroga (2019) existe una asociación clara entre el gen *mcr-1* y diferentes genes que codifican las β-lactamasas, particularmente la familia de las *bla* CTX-M (Quiroga C. et al, 2019).

En junio del 2018, Melgarejo et al. Encontró en Paraguay resistencia al colistín con el gen *mcr-1* y al simultáneamente resistencia a cefalosporinas CTX-M (Melgarejo et al., 2018).

2.2.12 Concentración mínima inhibitoria (CIM) para colistín

La susceptibilidad al colistín conlleva varias complicaciones por sus propiedades catiónicas intrínsecas. Sumado a esto, según un artículo publicado por Barry, detalla que existen problemas de difusión en aislados de enterobacterias diferentes a las *Pseudomonas*, lo cual genera una susceptibilidad falsa en comparación con el uso de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM). (International Standards, 2006; Hindler et al; Barry, 1974).

El comité Europeo de Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana (EUCAST) indica que los puntos de corte para *Enterobacteriaceae* es susceptible ≤2 mg/l y resistente > 2 mg/l (EUCAST, 2017).

El Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), facilita puntos de corte de difusión en disco únicamene para *Pseudomona aeruginosa,* por lo cual no se tiene establecido claramente cómo proceder con *Escherichia coli*, la recomendación de este es no proporcionar una intepreteción de resistente, intermedio o susceptible, sino defnir los aislamientos como cepa salvaje o no salvaje (CLSI, 2017).

En el año 2016 CLSI y EUCAST lanzaron una recomendación en conjunto la cual sugirió el método de CIM utilizando la ISO-20776 para colistín (EUCAST(2), 2016).

La CIM de colistín es un método recomendado para los laboratorios, por lo tanto, se evaluó en este estudio el método mencionado para determinar su susceptibilidad (E. Matuschek et al., 2017).

2.2.13 Animales y colistín

El colistín es la única forma aprobada en varios países en la producción porcina para el control de infecciones por *Enterobacteriaceae,* especialmente ara aquellas causadas por *Escherichia coli* (Cui et al., 2017). Sin embargo el uso indiscriminado en concentraciones subinhibidoras como promotores de crecimiento durante muchos años ha llevado a que las bacterias adquieran genes adicionales, generando resistencias bacterianas intrínsecas, difíciles de entender y combatir (Baquero et al., 2013) (Mendes V. et al., 2019).

En la última encuesta realizada en el 2012 por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) reveló que solo 10 países informaron su uso en alimento de animales como promotor de crecimiento (Quiroga C. et al, 2019). A partir del año 2000 después de décadas de uso del colistín en animales, surgieron varios estudios sobre el aumento en la tasa de resistencia al colistín en *Enterobacteriaceae* (Doumith M. et al, 2016) (Anjum M. et al, 2016).

Varios estudios apuntan a que una transferencia horizontal de genes es posible, debido a que los plásmidos de *mcr* son altamente transmisibles, pudiendo pasar esta condición entre bacterias, especialmente del género *Enterobacteriaceae* (Bradford P. et al, 2016) (Cao L et al, 2018).

2.3 MARCO CONCEPTUAL

CIM: es la más baja concentración de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación (Baquero et al., 2013).

CTX-M: Las enzimas tipo CTX-M son un grupo de lactamasas β de espectro extendido de clase A (BLEE) que se están propagando rápidamente entre las enterobacterias en todo el mundo. Los genes que codifican CTX-M han sido capturados del cromosoma de Kluyvera spp (Rossolini et al., 2008).

Gen *mcr:* el gen denominado Mobile Colistine Resistance por sus siglas *mcr,* el cual confiere una resistencia mediada por un plásmido por transferencia horizontal de genes (Liu Y. et al, 2016).

Plásmidos: son un conjunto de genes que se transfieren mediante conjugación, que codifican enzimas específicas que utilizan las bacterias para conferir resistencias ante los antibióticos (Blount et al., 2015).

Reacción en cadena de la polimerasa: con sus siglas PCR, es una técnica de biología molecular la cual consisten en obtener un gran número de copas de un fragmento de ADN especifico, para lo que se utilizan altas y bajas temperaturas para replicarlas, dejar que se separen y vuelan a unir y duplicarse, todo esto empleando polimerasas termoestables, generalmente extraídas de microorganismos que resisten estas temperaturas, las *Thermus aquaticus.* (Mullis, 1990).

Transferencia horizontal: es el paso de material genético entre organismos celulares de características parecidas, por medio de plásmidos (Smith et al., 2016).

CAPÍTULO III

3.1 MARCO METODOLÓGICO

3.1.1 Tipo de estudio

El presente fue estudio de tipo observacional, descriptivo y transversal ya que se determinó la presencia del gen *mcr* y sus variantes, en aislados de *Escherichia coli* procedentes de muestras fecales de pacientes que acudieron al Centro de Salud Tipo C de Guamaní, sin intervenir o modificar la unidad de análisis, únicamente describir a través de las características que plantea la investigación, además es transversal porque el estudio fue llevado a cabo en un tiempo determinado en la unidad de análisis y en el estudio.

3.1.2 Tipo de muestreo

Para el presente estudio, del total de muestras de heces fecales captadas por el INSPI durante el año 2018, provenientes del Centro de Salud Tipo C de Guamaní calculadas por el proyecto AGISAR-INSPI; siendo un muestreo no probabilístico por conveniencia de casos que cumplan con los criterios de inclusión, obteniendo un tamaño muestral de 150 heces fecales de las 300 captadas por el proyecto AGISAR-INSPI.

3.2 FASES METODOLOGICAS

3.2.1 Fase I. Solicitudes, aprobaciones y autorizaciones

Para el inicio de este estudio se recopiló los documentos requeridos por el INSPI–CZ9 para su revisión y aprobación. Una vez aprobado el estudio por parte de sus autoridades, se envió el oficio de aprobación ver Anexo 3 y el protocolo de investigación para su revisión y posterior aprobación, al Subcomité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la PUCE para garantizar que el estudio se ejecutó con las normas bioéticas vigentes.

Cabe destacar que esta investigación es parte del proyecto titulado “Prevalencia y resistencia antimicrobiana de *Campylobacter, Salmonella* y *E coli* ESBL en granjas avícolas, carne de aves de corral y casos de gastroenteritis humanas de octubre 2017 a Julio 2018 en el Distrito Metropolitano de Quito”, el cual cuenta con la aprobación del CEISH INSPI-LIP ver Anexo 4 y la autorización por parte de la Dirección Nacional de Inteligencia en Salud ver Anexo 5.

3.2.2 Fase II. Recolección de información

Los datos necesarios para el estudio se recabaron de las encuestas realizadas en el proyecto AGISAR – INSPI ver Anexo 6 luego de la autorización respectiva. Para asegurar la confidencialidad de los pacientes, se utilizó un código único determinado a cada paciente en el proyecto AGISAR – INSPI en todo documento escrito y electrónico, durante los ensayos de laboratorio. La información completa de los pacientes será manejada única y exclusivamente por el personal autorizado del CRN – RAM del INSPI y no estuvo al alcance del investigador en ningún momento.

3.2.3 Fase III. Procedimiento y análisis por laboratorio

3.2.3.1 Análisis microbiológico e identificación

Se realizó la siembra de las muestras de heces por agotamiento en agar MacConkey, se incubaron a 37°C de 18-20 horas, las cepas que presentaban fermentación, morfología de colonias medianas, circulares y convexas con bordes definidos redondeados, fermentadoras de lactosa, con un color rosado característica de *Escherichia coli* se aislaron para su posterior identificación bioquímica. La esterilidad de los medios de cultivo agar MacConkey fue evaluada al incubar el 5% de los medios preparados a 37°C por 24 horas ver Anexo 7.

Pruebas bioquímicas: las muestras que crecieron en agar MacConkey con aspecto de *Escherichia coli* fueron identificadas mediante bioquímicas manuales compuestas por: TSI,

urea, citrato, SIM, RM y VP ver Anexo 7. Las cepas de *Escherichia coli* fueron almacenadas en TE y BHI + glicerol al 20%, estas últimas a -70°C.

La selectividad del medio MacConkey y pruebas bioquímicas se realizó según la norma ISO/TS11133-2 al inocular una cepa de *Escherichia coli* ATCC® 25922, con el fin de evidenciar crecimiento de colonias fermentadoras de color rosado, otra cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 para visualizar crecimiento de colonias no fermentadoras con tonalidad verde y una cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 para observar ausencia de crecimiento después de 48 horas de incubación a 37°C ver Anexo 8.

Susceptibilidad antimicrobiana (microdilución en caldo)

La susceptibilidad antimicrobiana se realizó mediante el método de microdilución en caldo (MDC / BDM) bajo las normas del CLSI 2017 únicamente de las muestras positivas para el gen *mcr* mediante biología molecular. Se utilizó una placa para Gram negativos Thermo Scientific™ Sensititre™ Gram Negative GNX2F AST Plate ver Anexo 1, donde se dispensó 30ul de la cepa previamente sembrada en caldo Mueller Hinton cationes ajustados, posteriormente se dispensó 50 µl del caldo inoculado en cada pocillo, se incubó a 37°C por 24h para leer su resultado. El panel usado permitió determinar la CIM de cefepime, cefotaxima, ceftacidima, colistín, ertapenem, imipenem y meropenem.

3.2.4 Fase IV. Análisis Biología molecular

Los análisis de biología molecular consistieron en extraer el ADN de las cepas positivas para *Escherichia coli* y amplificar los genes *mcr* y CTX-M, todos estos ensayos fueron realizados en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Referencia Nacional e Resistencia a los Antimicrobianos (CRN-RAM) del INSPI.

3.2.4.1 Extracción de ADN a partir de la suspensión bacteriana

La extracción se realizó mediante ebullición. La cepa suspendida en 500ul de solución TE 1X, se homogenizó por vortex por 1 minuto, subsiguiente se realizó el lisado por ebullición en el equipo Thermomixer confort de Eppendorf® ver Anexo 1. El protocolo utilizado consistió en someter la suspensión bacteriana a 95°C durante 10 minutos, posteriormente centrifugarla por 5 minutos a 14.000 rpm, separar el sobrenadante y almacenarlo en un tubo Eppendorf® a -20 C° (Rebelo et al., 2018).

3.2.4.2 Amplificación e identificación de genes *mcr* por PCR convencional

Para la investigación de los genes se amplificó los sitios específicos descritos en la Tabla 1, pertenecientes a cada gen *mcr* siguiendo el protocolo detallado en el Anexo 9. Para esta PCR se utilizó controles positivos de cada variante del gen mcr (*mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 y mcr-5)* y un control negativo que fue agua del grado molecular, utilizados en cada corrida de la PCR ver Anexo 1.

Tabla 1. Secuencia de primers utilizados para la identificación del gen *mcr* y sus variantes

Nombre primer	Secuencia 5´ - 3´	Gen	Tamaño	Referencia
mcr1_fw	AGATCCTTGGTCTCGGCTTG	*mcr1*	320	(Rebelo et al., 2018)
mcr1_rev	AGATCCTTGGTCTCGGCTTG			
mcr2_fw	CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT	*mcr2*	715	(Rebelo et al., 2018)
mcr2_rev	TCTAGCCCGACAAGCATACC			
mcr3_fw	AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG	*mcr3*	929	(Rebelo et al., 2018)
mcr3_rev	AATGGAGATCCCCGTTTTT			

mcr4_fw	TCACTTTCATCACTGCGTTG			(Rebelo et al., 2018)
mcr4_rev	TTGGTCCATGACTACCAATG	*mcr4*	1,116	
mcr5_fw	ATGCGGTTGTCTGCATTTATC			(Borowiak et al., 2017)
mcr5_rev	TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG	*mcr5*	1,644	

Nota: fw: Forward, rev: Reverse. Adaptado de (Rebelo et al., 2018), por Kenny De La Torre, 2019.

Los genes fueron amplificados por la técnica de PCR convencional, realizando una PCR multiplex para los genes *mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 y mcr-5* con un volumen final de 25ul, conformada por los componentes del Anexo 10.

3.2.4.3 Amplificación e identificación de CTX-M por PCR convencional

Se amplificó los genes de los grupos CTX-M de las muestras positivas para *mcr*, para su posterior relación con las variantes del gen *mcr*. Los primers utilizados fueron los descritos por Dallenne y Cols (2010).

Tabla 2. Secuencia de primers utilizados para la identificación de CTX-M

Nombre primer	**Secuencia 5´ - 3´**	**Gen**	**Tamaño**	**Referencia**
MultiCTXMGp1_fw	TAGGAARTGTGCCGCTGYA	CTX-M group 1	688	(Dallenne C et al., 2010)
MultiCTXMGp1-2_rev	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT			
MultiCTXMGp2_fw	CGTTAACGGCACGATGAC	CTX-M group 2	404	(Dallenne C et al., 2010)
MultiCTXMGp1-2_rev	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT			
MultiCTXMGp9_fw	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	CTX-M group 9	561	(Dallenne C et al., 2010)
MultiCTXMGp9_rev	TGATTCTCGCCGCTGAAG			

Nota: fw: Forward, rev: Reverse. Adaptado de (Dallenne C et al., 2010), por Kenny De La Torre, 2019.

Los genes fueron amplificados por la técnica de PCR convencional para las variantes del gen CTX-M, utilizando los primers descritos anteriormente, con un volumen final de 25ul de la mastermix, conformada por los componentes detallados en el Anexo 7. Para la amplificación de los genes *mcr* se utilizaron las condiciones descritas por Rebelo et al., (2018) en el equipo BioRad C1000® detallado en el Anexo 11. Las condiciones de la PCR para la amplificación del gen CTX-M fueron las descritas por Dallene y Cols (2010). Esto se realizó en el equipo *BioRad C1000*® bajo las condiciones que se detallan a en el Anexo 11. Las muestras se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% con TAE 1X como buffer, a 90 V/cm por 1 hora en la cámara de electroforesis BioRad® Sub Cell Model 96 con una fuente de poder BioRad® Power Pac™ Basic. Se tiño el gel con Bromuro de Etidio (1mg/ml) y se reveló en el foto documentador BioRad® Molecular Imagen Gel System.

3.2.4.4 Purificación y secuenciamiento.

Para la secuenciación se utilizó únicamente las cepas positivas para una de las variantes del gen *mcr* y CTX-M mediante PCR convencional. Se purificó 12 amplicones con el kit Wizard® SV Gel on PCR Clean up System de Promega siguiendo los pasos detallados en el Anexo 12. Posteriormente se envió a Macrogen Corea a ser secuenciados.

3.2.5 Fase V. Interpretación de los resultados

Se interpreto las pruebas diagnósticas dependiendo de los resultados obtenidos; al evidenciar una banda en el gel de agarosa según el peso molecular del primer utilizado, indico la presencia de las variantes del gen *mcr*, así como el gen CTX-M.

3.3 ANALISIS DE DATOS

En el programa MEGA X se utilizó Clustal W para analizar las secuencias de forward y reverse de *mcr* y CTX-M obtenidas del secuenciamiento como lo recomienda (Kumar S et al, 2016), para limpiar los resultados y conseguir una secuencia consenso. Los resultados fueron comparados con las secuencias disponibles en el GenBank con la herramienta BLAST, para obtener un porcentaje de identidad entre ambas.

Los datos se tabularon mediante estadística descriptiva para obtener resultados en frecuencias relativas y absolutas. Los perfiles de susceptibilidad por CIM fueron trasladados a una hoja electrónica Microsoft Office – Excel, versión 2010 y expresados mediante gráficos de barras.

Manejo posterior de las muestras y resultados del estudio.

Ver Anexo 12.

CAPITULO IV

4.1 RESULTADOS

4.1.1 Aislamiento e identificación de *Escherichia coli*.

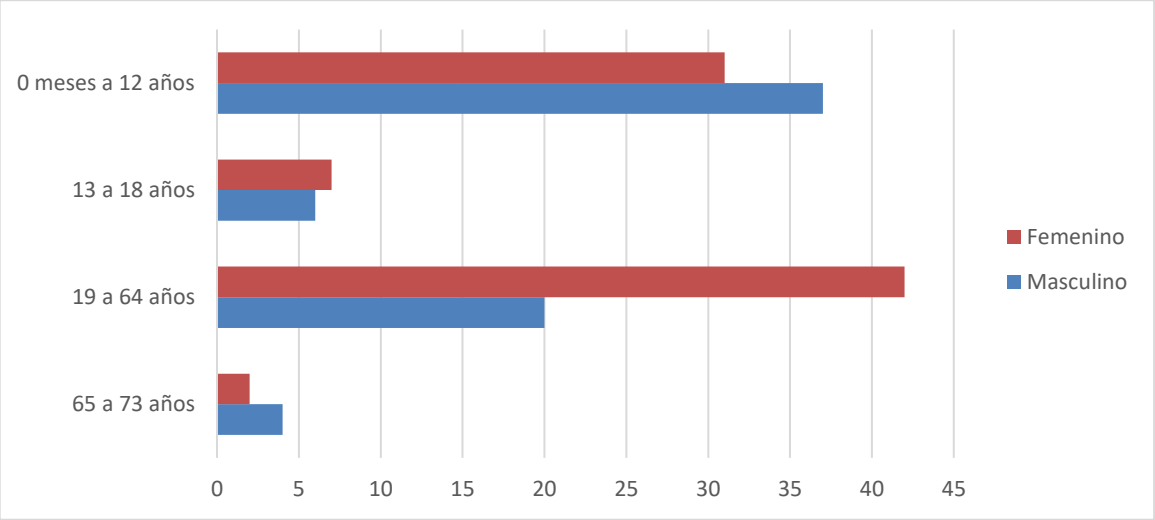
A partir enero a septiembre del 2018, mediante el proyecto AGISAR-INSPI se recolectaron 300 muestras de heces de pacientes que acudieron al área de emergencia del Centro de Salud Tipo C de Guamaní de las cuales se tomaron 150 muestras de heces para este estudio n=150, a las cuales se procedió a sembrar en agar McConkey donde se observaron colonias medianas, circulares y convexas con bordes definidos redondeados, fermentadoras de lactosa, con un color rosado. La identificación de especie y genero se realizó mediante pruebas manuales bioquímicas, donde se obtuvo el patrón de: Indol (+), H2S (-), Motilidad (+), RM (+), VP (-), TSI (A/A) indicando un resultado positivo para *Escherichia coli*, ver Anexo 2.

De las muestras analizadas (n=150) se obtuvo el 100% de positivas para *Escherichia coli.*

4.1.2 Datos epidemiológicos de la población de estudio.

El 45% de los pacientes corresponde al sexo masculino; en tanto que el 55% fueron de sexo femenino. Respecto a las edades, estuvieron comprendidas entre 0 a 73 años; el rango de edad más frecuente fue de 0 meses a 12 años con 68 muestras, como se observa en la Figura 1.

Figura 1. Representación del número de pacientes de acuerdo con el rango de edades en función del sexo.



Elaborado por: Kenny De La Torre.

Relación entre poseer el gen *mcr-1* con el rango de edad y el género de los pacientes.

De las encuestas utilizadas en este estudio, se obtuvo los datos relacionados a la edad de los pacientes, para evaluar una posible relación entre ser portador del gen *mcr-1* con los diferentes rangos de edad. Esto fue relacionado mediante la prueba de *Chi cuadrado* considerando una diferencia significativa con un valor de p < de 0,05. Se determino que no existe una relación estadísticamente significativa entre la edad de los pacientes y ser portador del gen *mcr-1*, como se observa en la Tabla 3.

Tabla 3. Relación entre poseer el gen *mcr-1* con el rango de edad de los pacientes.

Rango de edad del paciente	**Casos**		
	Pos. para mcr-1	***Neg. para mcr-1***	***Total***
0 meses a 12 años	3,3%	42,0%	45,3%
13 a 18 años	0,0%	8,0%	8,0%
19 a 64 años	4,7%	36,7%	41,3%
65 a 73 años	0,0%	5,3%	5,3%
Total	8,0%	92,0%	100%
Chi cuadrado de Pearson	Valor: 2,690; gl: 3; p-valor: 0,05		

Elaborado por: Kenny De La Torre S.

Por otro lado, el análisis realizado entre ser portador del gen *mcr-1* y el género de los pacientes, tampoco mostro una relación; es decir, al realizar la prueba del *Chi cuadrado* se obtuvo un valor de p < de 0,05. Determinándose que no existe relación estadísticamente significativa entre estas variables como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Relación entre poseer el gen *mcr-1* con el género de los pacientes.

	Casos		
Género	***Pos. para mcr-1***	***Neg. para mcr-1***	***Total***
Femenino	4,0%	50,7%	54,7%
Masculino	4,0%	41,3%	45,3%
Total	8,0%	92,0%	100%
Chi cuadrado de Pearson	Valor: 0,115; gl: 1; p-valor: 0,05		

Elaborado por: Kenny De La Torre S.

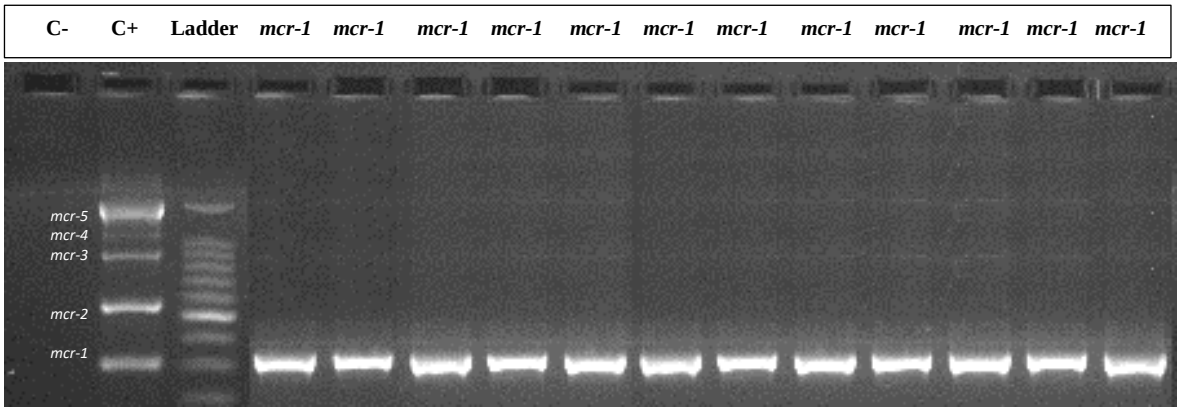
4.1.3 Identificación molecular del gen *mcr* y sus variantes

4.1.3.1 Amplificación del gen *mcr* y sus variantes.

El tamaño del producto amplificado y los primers del gen *mcr* y sus variantes se detallan en la Tabla 1, de los cuales fue evidenciado el gen *mcr-1* en 12 muestras. En la figura 2 se puede observar la amplificación de las cepas siguiendo el protocolo establecido ver Anexo 10.

Mediante la técnica de PCR convencional se realizó la amplificación de los genes *mcr-1*, *mcr-2, mcr-3, mcr- 4 y mcr-5*, de los cuales el 8% resultaron positivos para el gen *mcr-1*, mientras que el 92% restante resultaron negativas para los genes *mcr-2, mcr-3, mcr- 4 y mcr-5*, ver Figura 2.

Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de la amplificación de los genes *mcr-1*. Nota: C+: control positivo de *mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr- 4 y mcr-5*; C-: control negativo de *mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr- 4 y mcr-5.*

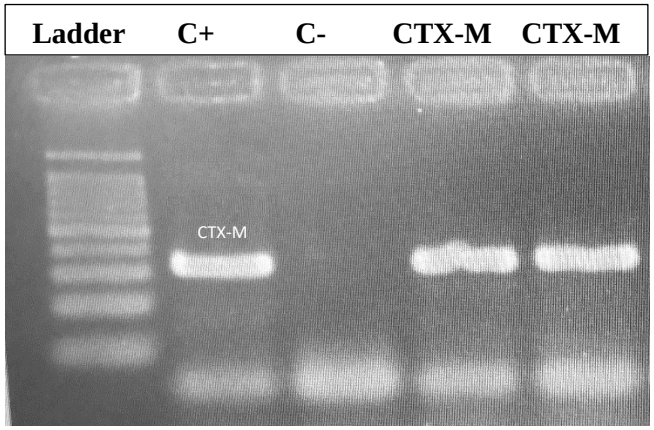


Elaborado por: Kenny De La Torre.

4.1.3.2 Amplificación del gen CTX-M.

Mediante la técnica de PCR convencional se observó que el 16% de las muestras resultaron positivas para el gen CTX-M del grupo 15, ver Figura 3.

Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de la amplificación del gen CTX-M. Nota: C+: control positivo de CTX-M; C-: control negativo de CTX-M; /: negativo para CTX-M.

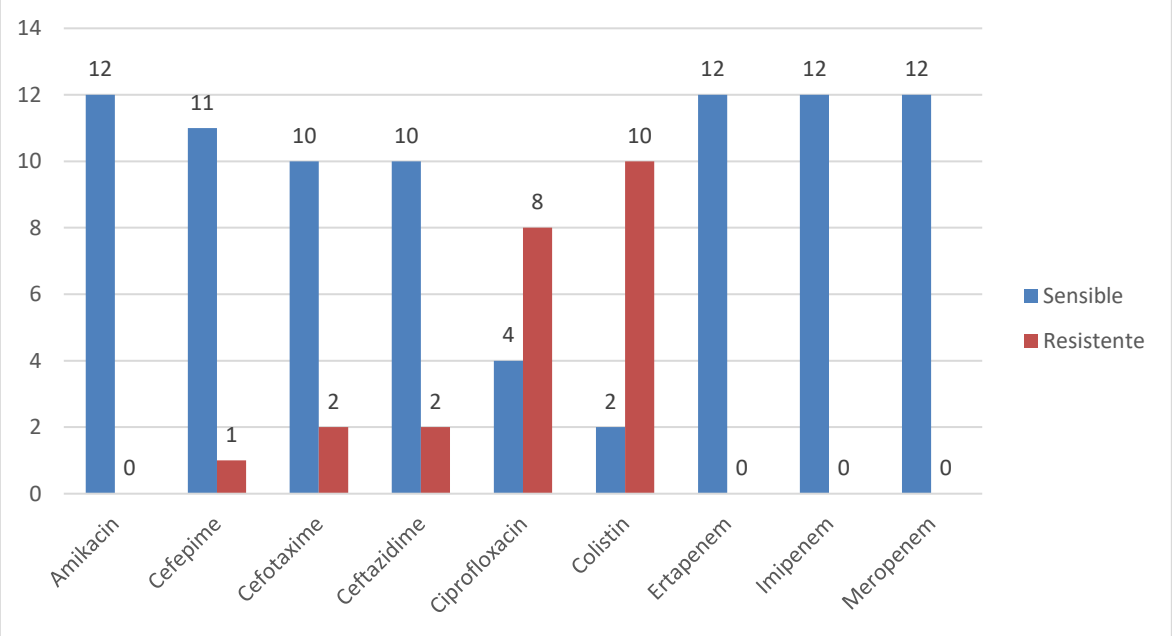


Elaborado por: Kenny De La Torre.

4.1.4 Evaluación de susceptibilidad antibiótica

Posterior al resultado de la PCR, las muestras positivas para el gen *mcr* se sometieron a una evaluación de susceptibilidad a través de CIM mediante el método automatizado Sensititre, donde se obtuvo resistencia a ciprofloxacina, colistín y levofloxacina en la mayoría de las muestras; estos y el resto de los antibióticos se detalla en la Figura 4.

Figura 4. Perfil de susceptibilidad antibiótica de las cepas de *Escherichia coli* mediante método CIM. La figura indica los porcentajes de resistencia para cada antibiótico.



Elaborado por: Kenny De La Torre.

En este método automatizado podemos observar un patrón resistente a colistín >4 ug/ml en la mayoría de las cepas, en tanto que en el resto se presenta una susceptibilidad con < 0,25 ug/ml. Por otra parte, se puede observar un 100% de susceptibilidad para carbapenémicos.

4.1.5 Análisis de secuencias.

Los primers forward y reverse del estudio tuvieron una complementariedad alta con los genes a estudiar. De las 150 muestras 12 resultaron positivas para *mcr-1*, y 2 para CTX-M, por lo tanto, estas 14 muestras fueron purificados sus amplicones y enviados a secuenciar en Corea; se obtuvo una secuencia consenso de las *mcr-1* y de las CTX-M que fueron editadas y limpiadas por el programa MEGA X. La similitud de las secuencias obtenidas fue confirmada en la plataforma BLAST, donde se obtuvo una similitud del 100% entre ellas y con *Escherichia coli mcr-1*.

La secuencia consenso fue de 298pb para el gen *mcr-1* para 12 de las 150 muestras testeadas; el resto de las muestras dieron negativas para *mcr-1* sus variantes, de igual manera para CTX-M.

Tabla 5. Identificación del gen *mcr-1* y CTX-M en cepas de *Escherichia coli.* La tabla detalla el código de la muestra, porcentaje de similitud por BLAST y el resultado.

Muestra	Similitud BLAST %	Resultado
CSG 2019 – 1	100%	*Escherichia coli mcr1*
CSG 2019 – 3	100%	*Escherichia coli mcr1*
CSG 2019 – 8	100%	*Escherichia coli mcr1*
CSG 2019 – 16	100%	*Escherichia coli mcr1*
CSG 2019 – 18	100%	*Escherichia coli mcr1*
CSG 2019 – 23	100%	*Escherichia coli mcr1*
CSG 2019 – 30	100%	*Escherichia coli mcr1*

CSG 2019 – 31	100%	*Escherichia coli mcr1*
CSG 2019 – 42	100%	*Escherichia coli mcr1*
CSG 2019 – 89	100%	*Escherichia coli mcr1*
CSG 2019 – 110	100%	*Escherichia coli mcr1*
CSG 2019 – 118	100%	*Escherichia coli mcr1*
CSG 2019 – 16	100%	*Escherichia coli CTX-M 15*
CSG 2019 – 23	100%	*Escherichia coli CTX-M 15*

Elaborado por: De La Torre K.

Se puede observar 100% de similitud entre las cadenas de aminoácidos y nucleoticas entre los genes obtenidos en GenBank y la secuencia consenso. En las siguientes figuras podemos observar la similitud del alineamiento del gen completo de *mcr-1* y el gen CTX-M 15.

Figura 5. Alineamiento de la secuencia del gen *mcr-1* y de la secuencia consenso.



Elaborado por: De La Torre K.

Se puede evidenciar la homología entre las secuencias nucleotídicas consenso de *mcr-1* y la del gen completo de *mcr-1* proveniente del GenBank **(**número de acceso KY550359.1). (*) Indica que los pares de bases son idénticos.

Figura 6. Alineamiento de la secuencia del gen CTX-M y de la secuencia consenso.



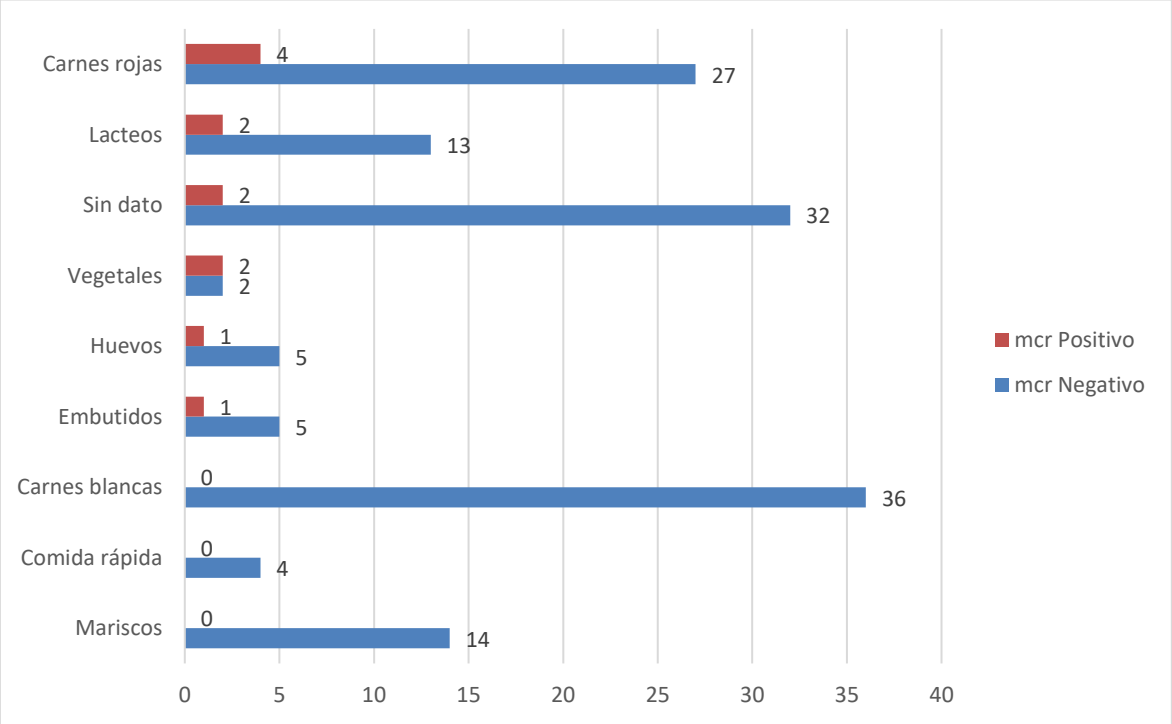
Elaborado por: De La Torre K.

Se puede evidenciar la homología entre las secuencias nucleotídicas consenso de CTX-M y la del gen completo de CTX-M 15 proveniente del GenBank **(**número de acceso NG_048935). (*) Indica que los pares de bases y aminoácidos son idénticos.

4.1.6 Resultado de la encuesta

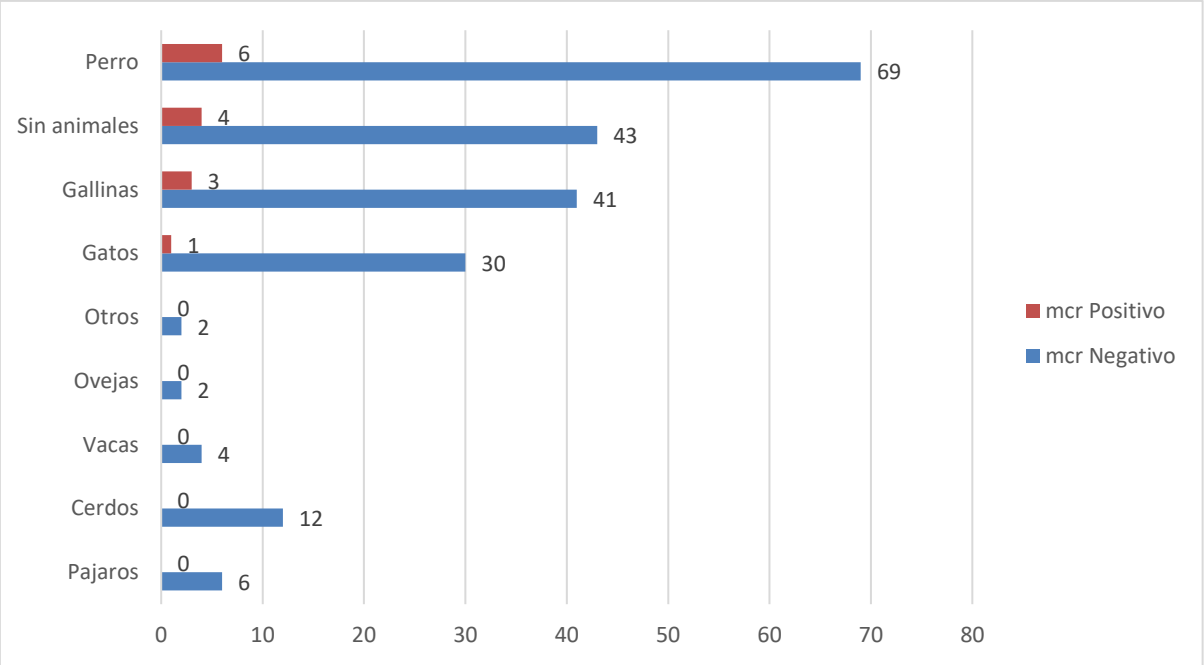
De los aislados positivos para el gen *mcr*, se analizó las preguntas 1. y 7. del "Consentimiento Informado y Encuesta Proyecto AGISAR – INSPI", ver Anexo 6, donde se obtuvo una gran variabilidad en las respuestas por parte de los encuestados como se detalla en la Figura 7 y Figura 8.

Figura 7. Representación de la frecuencia de resultados de la pregunta 1 de las encuestas del proyecto AGISAR-INSPI. Se relaciona la positividad o negatividad de ser portador de gen *mcr* frente al alimento consumido previo a la recolección de las muestras fecales.



Elaborado por: De La Torre K.

Figura 8. Representación de los resultados de la pregunta 7 de las encuestas del proyecto AGISAR-INSPI. Se relaciona la positividad o negatividad de ser portador de gen *mcr* frente a animales de compañía o de granja.



Elaborado por: De La Torre K.

Relación de la presencia del gen *mcr-1* y poseer animales de granja o domésticos.

De las respuestas obtenidas por parte de las encuestas de cada uno de los pacientes que participaron en este estudio, se comprobó que no existe una relación significativa entre poseer animales domésticos o de granja con ser portador del gen *mccr-1*, mediante la prueba de *Chi cuadrado* con un valor de $p < 0,05$ como indica la Tabla 6.

Tabla 6. Relación de la presencia del gen mcr-1 y poseer animales de granja o domésticos.

	Casos		
Animales	***Pos. para mcr-1***	***Neg. para mcr-1***	***Total***
Posee	4,7%	64,0%	68,7%
No posee	3,3%	28,0%	31,3%
Total	8,0%	92,0%	100%
Chi cuadrado de Pearson	Valor: 0,647; gl: 1; p-valor: 0,05		

Elaborado por: De La Torre K.

CAPITULO V

5.1 DISCUSIÓN

5.1.1 Prevalencia de *Escherichia coli mcr-1*

El gen *mcr* es considerado un problema emergente, debido a sus múltiples reportes alrededor del mundo y al incremento de su incidencia (Arcilla et al, 2016). Por lo general el gen *mcr* ha sido relacionado a infecciones que se transmiten horizontalmente entre animales y humanos (Wise et al, 2018). El aislamiento de *Escherichia coli* con el gen *mcr* resistente al colistín es complicado en métodos de rutina de laboratorio (Chabou S. et al, 2016) (Osei O., 2018). Los métodos como agar y caldo con colistín aunque identifican de manera rápida bacterias Gram negativas resistentes al colistín, pueden inhibir bacterias que no sean resistentes que pueden ser cruciales con fines de vigilancia epidemiológica (Chew K. et al., 2017) (Momin A. et al., 2017). Además, el método de difusión de disco no es un método confiable debido a la pobre difusión de colistín en el agar (Turlej-Rogacka A. et al, 2018) (Lo-Ten-Foe J. et al, 2007). El tiempo de espera para un resultado mediante estos métodos es largo entre 18 a 24 horas, lo cual es una desventaja (Bardet L. et al, 2017) (Nordmann P. et al., 2018). Es importante mencionar que la especificidad y sensibilidad de estos métodos es considerablemente baja respecto a métodos moleculares (Bardet L. et al, 2017) (Chabou S. et al, 2016). En el presente estudio, el gen *mcr-1* se detectó en 12 cepas (8%) de *Escherichia coli* recolectadas de pacientes que acudieron al Centro de Salud Tipo C de Guamaní, de 150 muestras (n=150) analizadas. Contrario a otros estudios realizados en nuestra región, donde la prevalencia de resistencia al colistín mediada por el gen *mcr-1* en *Enterobacteriaceae* fue del 1,5% (Bradford P. et al, 2016), sin embargo en Colombia un estudio realizado por Saavedra (2017) determinó la resistencia a colistín en varias

Enterobacteriaceae dando como resultado una prevalencia del 3,5% de *Escherichia coli* positivos para el gen *mcr,* esta prevalencia aunque es alta referente a otros estudios a nivel mundial. En el estudio de Chan (2018) en Asia es contrario a esta prevalencia, el cual obtuvo un 2,08% de muestras positivas para *mcr-1* y al estudio de Wise (2018) donde el 2,98% de muestras estudiadas para *mcr* y sus variantes resultaron positivas para *mcr-1* (Saavedra S. et al, 2017) (Chan W. et al, 2018) (Wise et al, 2018). Cabe destacar también que el resultado de este estudio es contrario a lo reportado hasta la fecha en la comunidad europea, donde la prevalencia del gen *mcr-1* va entre 0% - 0,92% Zurfluh (2017) y Arcilla (2016) y respectivamente (Arcilla et al, 2016) (Zurfluh K et al, 2017). No obstante, es necesario mencionar que el único caso reportado hasta el momento de una prevalencia alta es un grupo de granjeros de Vietnam, donde se observó el 34,7% de *Escherichia coli mcr-1* positivos, y se atribuyó el resultado a la exposición entre los granjeros y las aves de corral que ellos criaban (Vinh N. et al, 2017). La ausencia de las variantes *mcr-2, mcr-3, mcr- 4 y mcr-5* en este estudio pueden atribuirse a la limitada diseminación de estos genes ya que estas son más frecuentes en muestras clínicas en humanos y en animales como cerdos, terneros y aves de corral (García et al., 2018), estas variantes del gen *mcr* se han identificado recientemente como demuestran los estudios de (Borowiak et al., 2017) (Carattoli A, 2017) (Xavier et al., 2016) y (Yin W et al, 2017).

De acuerdo con los resultados del presente estudio, la población portadora del gen *mcr-1* fue la pediátrica (rango 0 – 12 años) con 5 niños 42% con una media de 4,8 años respecto a 47% que fueron de pacientes adultos (rango 18 – 73 años). Esto se debe principalmente porque las muestras clínicas fueron en su mayoría procedentes del centro de salud el cual atiende en su mayoría niños. Esta población al estar expuesta a serios factores de riesgo como detalla Sani (2018) en un estudio sobre la prevalencia de *mcr-1* indica que la mayor frecuencia de diarreas es causada por *Escherichia coli* en niños por los hábitos alimenticios, este patógeno

es uno de los causantes de alrededor de 2,2 millones de muertes relacionadas a alimentación e higiene, donde es su gran mayoría son niños. Sin embargo, contrario al presente estudio, Terveer (2017) reportó una media de edad de 62 años (rango 18-93 años) y al estudio realizado por Cao (2018) que menciona que su rango de edad de pacientes oscilo entre 30 a 70 años. Sin embargo, según Wang (2017) la edad del paciente no está asociada al gen *mcr*, observando que no existe una asociación directa con la positividad de *mcr-1* ya que no es evidente una tendencia marcada en edades (Sani et al, 2018) (Terveer et al, 2017) (Cao L et al, 2018) (Wang et al, 2017).

Cabe destacar que un estudio para determinar la presencia de *mcr* realizado en Bolivia a niños de edad escolar sanos de ciudades rurales de ese país por Giani (2018), obtuvo una media de edad de 9,2 años, contrario a este estudio que aunque el rango de edad con mayor prevalencia fue 0 a 12 años su media marco 4,8 años (Giani T et al, 2018).

5.1.2 Susceptibilidad antibiótica de *Escherichia coli mcr-1*

La especie *Escherichia coli* se caracteriza por ser muy susceptible a generar multirresistencias, generando un problema para tratamientos antibióticos eficaces (Aguilar, 2015). Aunque *Escherichia coli* no se caracteriza por tener una resistencia a carbapenémicos o colistín, en el país, no se ha investigado ampliamente el estado actual de estas resistencias (Ortega P. et al., 2016) (Mendes V. et al., 2019).

En este estudio, con respecto a los carbapenemicos ertapenem, imipenem y meropenem las muestras presentaron un 100% de sensibilidad dato similar al estudio de Wang (2017) el cual obtuvo 97%, 99% y 100% de sensibilidad respectivamente por el método de CIM, de igual manera respecto al estudio de Cao (2018) donde todos sus aislamientos de *mcr-1* fueron susceptibles a carbapenemicos, ya que estos antibióticos son muy estables a la hidrolisis

causada por BLEE (Wang et al, 2017) (Cao L et al, 2018) (Aguilar, 2015). En contraste, ninguno de los asilamientos *mcr-1* positivos resultaron resistentes a imipenem, ertapenem y meropenem, dato exactamente igual al reportado por García (2018) el cual investigo *mcr-1*, *mcr-4 y mcr-5* dando como resultado un perfil de susceptibilidad igual al reportado en este estudio y a un estudio en Argentina y Canadá por Tijet (2017) donde todos sus aislamientos fueron susceptibles a estos antibióticos (García et al., 2018) (Tijet N. et al, 2017).

En este estudio, dos muestras 1,33% fueron positivas para el gen *mcr*, presentaron sensibilidad al colistín mediante CIM, dato similar al reportado por Giani (2018) donde obtuvo un 1,77% de prevalencia de sensibilidad a colistín en muestras positivas para el gen *mcr*, aunque por el momento no se tiene una explicación exacta de este fenómeno, según se deduce es posible que en la prueba de CIM la resistencia a colistín se encuentre asociada a diferentes genes que confieren resistencia cromosómica a variantes del gen *mcr* o a otros polipéptidos de las *Escherichia coli* (Giani T et al, 2018) (Ugarte R. et al, 2018). Sin embargo datos son contrario al de Fernández (2016) el cual obtuvo un 0,16% de muestras susceptibles a colistín, y también al estudio de Wise (2018) que recolecto muestras en los 5 continentes entre el año 2014 – 2016, obteniendo como resultado ningún aislado positivo para *mcr* que sea sensible al colistín (Fernandes et al, 2016) (Wise et al, 2018).

Es importante recalcar que el gen *mcr* que confiere resistencia al colistín, puede pasarse por alto en países como Brasil, según un estudio realizado por Fernández (2016) donde por protocolos internos únicamente a las cepas resistentes a carbapenémicos se les evalúa la susceptibilidad al colistín, esto puede deberse también a un bajo nivel de resistencia que presenta la bacteria y que puede contribuir a una diseminación silenciosa del plásmido, y estos resultados pueden pasarse por alto si solo se prueba colistín en aislamientos resistentes a colistín; se conoce que aproximadamente desde el 2012 existe una posible transmisión del

gen *mcr* hacia América del Sur por viajeros provenientes desde Europa y Asia según Arcilla (2016), donde la diseminación de patógenos resistentes entre esto *Escherichia coli mcr-1*, se asocian a las altas tasas de fracaso al tratamiento y al uso de multiantibioticos (polimixinas) principalmente en las unidades de cuidados intensivos (Fernandes et al, 2016) (Arcilla et al, 2016).

5.1.3 Gen de resistencia CTX-M presente en *Escherichia coli* positivo para el gen *mcr-1*

A nivel mundial, la acumulación de resistencias tanto intrínsecas como adquiridas a antibióticos constituyen factores preocupantes dentro de la salud. Respecto al gen de la β-lactamasa CTX-M, de las muestras antes mencionadas (n=150) dos de estas, el 1.33% fueron positivas para el gen CTX-M 15 con presencia simultánea del gen *mcr-1*, dato similar al de Wise (2018) que obtuvo un 1% de muestras portadoras del gen CTX-M y *mcr*, también similar al estudio de en Bolivia, donde se observó un 1,78% de *Escherichia coli* positivos para *mcr* y el gen CTX-M (Wise et al, 2018) (Giani T et al, 2018). Así mismo, el Centro Nacional de Investigación de Referencia del Ecuador (2018) en el mismo año de este estudio 2018 revela que un 3,52% de muestras presenta el gen *mcr* y CTX-M (CRN-RAM, 2019).

Por otra parte las muestras positivas a CTX-M 15 resultaron resistentes a cefepime, cefotaxima y ceftacidima, dato igual al reportado de un aislamiento canadiense por Tijet (2017), Zhang (2016) y al de Guiral (2011), que demostró la resistencia a cefalosporinas debido a la coexistencia con el gen de la β-lactamasa CTX-M 15 (Tijet N. et al, 2017) (Zhang R (2) et al, 2016) (Guiral E et al, 2011) (Moremi et al, 2017).

En este estudio, 68% de las muestras resultaron resistentes para las quinolonas levofloxacina y ciprofloxacina, dato similar al de Gurnee et al (2015) el cual obtuvo el 91% de aislamientos de *Escherichia coli* resistente a múltiples antibióticos, esto podría explicarse ya que estos

antibióticos son utilizados como primera opción terapéutica para infecciones gastrointestinales, además el patógeno común para una persona sana, adulto o niño/a es *Escherichia coli* con una prevalencia alta de ser resistente a quinolonas (Gurnee et al, 2015).

5.1.4 Relaciones entre las preguntas de la encuesta y *Escherichia coli* con el gen *mcr-1*

De acuerdo a los análisis de las preguntas de la encuesta, la convivencia con animales domésticos o de granja es muy diversa y no se establece una relación estadísticamente significativa entre ser portador del gen *mcr-1* y habitar con estos animales; Wang (2017) explica que existe una asociación débil entre ser portador de *Escherichia coli mcr* y vivir cerca de granjas de animales, dato contrario al de Yi-Yun (2016) el cual mostro una estrecha relación entre ser portador de *Escherichia coli mcr-1* y convivir con animales de granja y sus prácticas de cría (Wang et al, 2017) (Yi-Yun L. et al., 2016). Sin embargo, en China se investigó las heces de un paciente positivo para el gen *mcr-1* que trabajaba en una tienda de animales, donde 5 perros y 2 gatos poseían el gen *mcr* en sus heces, obteniendo como resultado que 4 cepas de *Escherichia coli mcr-1* positivo de perros se relacionaban clonalmente con la cepa positiva para *mcr-1* del paciente como detalla Lei (2017), lo que sugiere que las *Escherichia coli* portadoras del gen *mcr* y sus variantes pueden ser transferidos de animales de compañía o domésticos a los seres humanos (Lei L. et al., 2017) (Zhang (3) et al, 2016). También en el Ecuador, Ortega (2019) descubrió que 20 de 50 heces de perros recolectadas de un parque público en la ciudad de Quito presentaban el gen *mcr-1* (Ortega D et al., 2019). Por lo tanto según este estudio es muy llamativo que pacientes que manifestaron vivir con perros, gatos y gallinas posean el gen *mcr-1* en sus heces, este dato podría inferir que los animales mencionados poseen este gen y pudo haberse transmitido de animales a humanos (Dalmolin T. et al., 2018) (Liu Y. et al, 2016). Es importante mencionar

que la mayor cantidad de publicaciones sobre transferencia de genes resistentes al colistín se relacionan con cerdos y en este estudio no se obtuvo ningún paciente positivo para el gen *mcr-1* que conviva con estos animales (Yi-Yun L. et al., 2016). Otro dato llamativo es que 4 pacientes no poseían ningún animal, pero presentaron el gen *mcr-1*, este dato puede ser explicado ya que el centro de salud de donde se tomaron las muestras se encuentra en el área rural de la ciudad de Quito donde habitan una gran cantidad de animales de granja especialmente mamíferos, por lo tanto puede que el gen haya sido contraído al tener un contacto indirecto con estos animales (Brito J. et al., 2019).

Según el alimento consumido por el paciente previo a acudir al centro de salud, se pudo determinar que por la gran variabilidad de respuestas, no es posible establecer una relación directa entre el alimento y la presencia de *Escherichia coli* con el gen *mcr*, sin embargo en Argentina Domínguez (2019) presento un reporte en el cual analizó muestras de pollos de corral *Escherichia coli mcr-1* positivos frente a reportes de *Escherichia coli mcr-1,* mostrando una diseminación efectiva por transferencia horizontal mediada por plásmidos ya que se observó los mismos plásmidos de los aislamientos en pollos como en los de humanos (Dominguez et al, 2019). Sin embargo, 4 pacientes positivos para *Escherichia coli* portador del gen *mcr-1* refirieron haber consumido carnes rojas previa a la recolectar sus muestras fecales, esto puede deberse a la falta de cocción de los alimentos, los cuales pueden ser portadores del gen *mcr-1* y de esta manera haberse transferido a los pacientes. También es importante mencionar que existe una mayor detección del gen *mcr-1* en alimentos que se consumen sin cocinar o son procesar como vegetales o frutas, pudiendo explicar que en este estudio 2 pacientes que consumieron vegetales previos a la entrega de sus muestras fecales, resultaron ser positivos para el gen *mcr-1* (Yang F. et al., 2019). Es importante destacar que la aplicación de estiércol animal como abono para plantas productoras de alimentos es un factor predisponente para la transmisión de bacterias productoras de *mcr-1* (Zheng B. et al.,

2017). En un estudio realizado en Egipto se detectó el gen *mcr-1* en lácteos de venta popular, lo que sugiere que puede existir una relación de transferencia de genes horizontal entre los 2 pacientes positivos para el gen *mcr-1* y haber consumido este alimento (Hammad A. et al, 2019). Aunque hay datos limitados sobre la diseminación del gen *mcr-1* en huevos de gallina y embutidos para consumo humano, la presencia *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* en aves de corral y granjas porcinas son considerados un factor de riesgo directo al ser capaces de transferir genes de resistencia como BLEE y *mcr* (Del Bianco F. et al., 2018) (Verraes C. et al., 2013).

Finalmente cabe destacar que la resistencia al gen *mcr* esta mediada por plásmidos, en un estudio del estado del arte realizado a nuestra región Sudamérica y el Caribe sobre la prevalencia del gen *mcr*, se encontró que el plásmido IncX4 es el más frecuente en este territorio, pudiendo ser el vector clave responsable de la diseminación del gen *mcr-1* en América Latina (Mendes V. et al., 2019).

5.2 CONCLUSIONES

La prevalencia obtenida en este estudio sobre la detección del gen *mcr* y sus variantes sugiere que la propagación del gen *mcr-1* es alta a nivel comunitario, en los pacientes que acuden al Centro de Salud de Guamaní, lo que representa un mecanismo de resistencia relevante en contexto, por lo tanto, debe prestarse mucha atención a la detección oportuna de este gen.

Aunque no se encontró una relación estadísticamente significativa entre el alimento consumido antes de acudir al centro de salud, varios estudios demostraron que el gen *mcr-1* podría ser capaz de transmitirse horizontalmente a través de la cadena alimentaria, generalmente entre aves y humanos, por sus numerables reportes actualmente.

Por la gran variedad de datos respecto al animal de convivencia con los pacientes, se determinó que no existe una relación estadísticamente significativa entre ser portador de *Escherichia coli* positivo para el gen *mcr* y poseer un animal doméstico o de granja, existen varios estudios que apoyan posibilidad de transmitir el gen *mcr-1* de animales domésticos o de compañía hacia los humanos, especialmente perros y gatos.

Respecto a la relación entre la edad y genero de los pacientes con ser portador de *Escherichia coli* positivo para el gen *mcr-1*, la prueba estadística de *chi cuadrado* demostró que no existe relación significativa entre estas variables, no obstante se observó que en esta población la mayor prevalencia de casos se reportó en niñas con una media de edad de 5,7 años.

Las cepas de *Escherichia coli* portadoras gen *mcr-1* y el gen CTX-M 15, presentaron un patrón esperado en la CIM, con excepción de 2 muestras 1,33% de *mcr-1* que resultaron sensibles a colistín, posiblemente esta condición se encuentra asociada a diferentes genes que confieren resistencia cromosómica a variantes del gen *mcr-1* o a los polipéptidos de las *Enterobacteriaceae.*

Por la importancia que presenta este antibiótico utilizado de última línea para tratamientos hospitalarios contra bacterias Gram negativas, es importante conocer el tipo de *mcr* que puede manifestarse ya que complica la interpretación del perfil de susceptibilidad manual o automatizado, de aquí la importancia de confirmar fenotípicamente las muestras después de su análisis molecular.

Si bien no existe una relación directa entre ser portado de *Escherichia coli* positivo para el gen *mcr* con tener además el gen CTX-M, es muy importante garantizar una vigilancia activa frente a colistín mediante el método de microdilución en caldo, ya que varios países tienen como protocolo solamente investigarlo si el perfil de susceptibilidad del primer análisis,

resulta resistente a carbapenémicos, pudiendo generar una diseminación silenciosa de genes de resistencia como *mcr* y sus variantes.

Esta información actualizada sobre la aparición de genes *mcr* en aislamientos bacterianos en heces de humanos es esencial para anticipar las tendencias a futuro con respecto a la prevalencia y la diseminación de la resistencia por plásmidos al colistín.

5.3 RECOMENDACIONES

Es recomendable realizar de manera prioritaria, estudios epidemiológicos para evaluar la prevalencia del gen *mcr* y sus variantes, así como la administración de antibióticos con la finalidad de monitorear multirresistencias, evitando la propagación de estos mecanismos de resistencia.

La monitorización continua es muy importante para determinar la prevalencia del gen *mcr* y sus variantes entre bacterias gran negativas tanto en humanos, animales y medio ambiente. Por la elevada prevalencia del gen *mcr-1* encontrada en *Escherichia coli*, se recomienda continuar con estudios complementarios que puedan identificar las variantes del gen *mcr-1* como la caracterización y secuenciación del plásmido responsable de su expresión. Así como alinear los resultados para compararlos con la base de datos en el GeneBank.

Debido a que ciertas muestras presentaron el gen *mcr* pero no expresaron resistencia, es recomendable realizar estudios mediante Real Time PCR para conocer de manera cuantificada la cantidad de ADN presente.

La reevaluación de la aplicación de colistín en animales como promotor de crecimiento y a su vez la implementación de un cribado constante de animales en pie y carne a la venta para genes *mcr* sería una medida muy importante para prevenir la propagación de estos genes a humanos por transferencia horizontal.

Se podría profundizar estudios sobre la prevalencia del gen *mcr* a nivel hospitalario, y entre comunidades de la costa, sierra y oriente ecuatoriano con el fin obtener datos que aporten para su control.

Es importante prestar atención a los protocolos utilizados por los laboratorios ya que se puede pasar por alto diferentes fenotipos de *mcr* ya que suelen ser susceptibles a carbapenémicos, y esto puede contribuir a la diseminación silenciosa de la resistencia al colistín. De todos modos, se debería hacer conocer a todos los laboratorios de microbiología del país sobre el manual de vigilancia de resistencia a los antimicrobianos dotada por el INSPI para conocer cómo proceder.

BIBLIOGRAFÍA

Aguayo A. et al, M. S.-R. (2016). *Colistín en la era post-antibiótica.* Obtenido de Rev Chil Infectol: http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182016000200006

Aguilar, Z. D. (30 de 03 de 2015). *E. coli BLEE, la enterobacteria que ha atravesado barreras*. Obtenido de Fundación Clínica Médica Sur: https://www.medigraphic.com/pdfs/medsur/ms-2015/ms152b.pdf

Anjum M. et al, N. A.-G. (08 de 2016). *Colistin resistance in Salmonella and Escherichia coli isolates from a pig farm in Great Britain* . Obtenido de Journal of Antimicrobial Chemotherapy: https://doi.org/10.1093/jac/dkw149

Arcilla et al, v. H. (2016). *Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene*. Obtenido de Lancet Infect Dis: https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00541-1 PMID: 26711361

Baquero et al., T. A. (06 de 03 de 2013). *Resistencia a los antibióticos que da forma a la biología de la población de múltiples niveles de bacterias.* Obtenido de Front Microbiol: 10.3389/fmicb.2013.00015

Bardet L. et al, B. L. (2017). *LBJMR medium : A new polyvalent culture medium for isolating and selecting vancomycin and colistin-resistant bacteria LBJMR medium: A new polyvalent culture medium for isolating and selecting vancomycin and colistin-resistant bacteria.* Obtenido de BMC Microbiology,: https://doi.org/10.1186/s12866-017-1128-x

Baron S. et al, L. H.-M. (2016). *Mecanismos moleculares de la resistencia a la polimixina: conocidos y desconocidos*. Obtenido de Int J Antimicrob Agents: https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.06.023

Blanco G. et al., L. J. (2014). *Latin America Working Groupon Bacterial Resistance. Extended spectrum β-lactamase producers among nosocomial Enterobacteriaceae in Latin America.* Obtenido de Braz J Infect Dis.: https://doi.org/10.1016/j.bjid.2013.10.005

Blount et al., Z. D. (25 de 03 de 2015). *MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASE ECOLOGY.* Obtenido de The Natural History of Model Organisms: The unexhausted potential of E. coli: 10.7554/eLife.05826

Borowiak et al., F. J. (2017). *Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, mcr-5, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi B.* Obtenido de J Antimicrob Chemother: 10.1093/jac/dkx327

Bradford P. et al, K. M. (26 de 02 de 2016). *Correlation of β-Lactamase Production and Colistin Resistance among Enterobacteriaceae Isolates from a Global Surveillance Program*. Obtenido de Antimicrobial Agents and Chemotherapy: https://doi.org/10.1128/AAC.01870-15

Brito I. et al. (2016). *Mobile genes in the human microbiome are structured from global to individual scales.* . Obtenido de Nature.: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4983458/

Brito J. et al., C. M. (2019). *Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador*. Obtenido de Mamíferos del Ecuador.: https://bioweb.bio/faunaweb/mammaliaweb/Biodiversidad/

Bruno C, S. M. (2015). *Uso de colistina en el hospital nacional Edgardo Rebagliati Martins en el período febrero a agosto 2012*. Obtenido de UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS :

http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/4553/Bruno_cs.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Burmeister A. (2015). *Horizontal Gene Transfer*. Obtenido de Evol Med Public Health. : https://dx.doi.org/10.1093%2Femph%2Feov018

Cao L et al, X. L. (26 de 09 de 2018). *Prevalence and molecular characteristics of mcr-1 colistin resistance in Escherichia coli: isolates of clinical infection from a Chinese University Hospital*. Obtenido de Infect Drug Resist: 10.2147/IDR.S166726

Carattoli A, V. L. (03 de 08 de 2017). *Novel plasmid-mediated colistin resistance mcr-4 gene in Salmonella and Escherichia coli, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016.* Obtenido de Euro Surveillevance: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30589.

Carretto et al., B. F. (2018). *Detection of mcr-4 positive Salmonella enterica serovar Typhimurium in clinical isolates of human origin, Italy, October to November 2016.* Obtenido de Eurosurveillance: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.2.17-00821

Carroll L. et al., A. G. (2019). *Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene mcr-9 in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible Salmonella enterica Serotype Typhimurium Isolate*. Obtenido de American Society for Microbiology: https://doi.org/10.1128/mBio.00853-19

Castellanos . et al., D.-G. P. (2017). *High heterogeneity of Escherichia coli sequence types harbouring ESBL/AmpC genes on IncI1 plasmids in the Colombian Poultry Chain.* Obtenido de PLoS One. : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5268450/

Chabou S. et al, L. T.-M. (2016). *Real-time quantitative PCR assay with Taqman((R)) probe for rapid detection of MCR-1 plasmid-mediated colistin resistance.* Obtenido de New Microbes and New Infections,: https://doi.org/10.1016/j.nmni.2016.06.017

Chan W. et al, A. C. (02 de 2018). *Prospective study on human fecal carriage of Enterobacteriaceae possessing mcr-1 and mcr-2 genes in a regional hospital in Hong Kong.* Obtenido de BMC Infect Dis: 10.1186/s12879-018-2987-y.

Chew K. et al., L. M.-V. (2017). *olistin and polymyxin B susceptibility testing for carbapenem-resistant and mcr-positive enterobacteriaceae: Comparison of sensititre, microscan, vitek 2, and etest with broth microdilution.* Obtenido de Journal of Clinical Microbiology,: https://doi.org/10.1128/JCM.00268-17

CLSI. (2017). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne,PA: 27th ed. CLSI document M100-S27.

CRN-RAM. (2019). *Prevalencia del gen mcr 1 y el gen CTX-M.*

CRN-RAM, C. D. (2019). *MANUAL DE VIGILANCIA DEL CENTRO DE REFERENCIA NACIONAL DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS (CRN-RAM).* Quito: Ministerio De Salud Publica.

Croxen et al, R. J. (03 de 10 de 2013). *Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic Escherichia coli*. Obtenido de Clinical Microbiology Reviews: 10.1128/CMR.00022-13

Cui et al., J. Z.-c. (16 de 10 de 2017). *Distinct mechanisms of acquisition of mcr-1 –bearing plasmid by Salmonella strains recovered from animals and food samples.* Obtenido de NATURE: https://www.nature.com/articles/s41598-017-01810-4

Cullen T. et al. (2015). *Gut microbiota. Antimicrobial peptide resistance mediates resilience of prominent gut commensals during inflammation.* Obtenido de Science: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4388331/

Cuzon G. et al., N. T. (2013). *Dissemination of the KPC-2 carbapenemase in non-Klebsiella pneumoniae enterobacterial isolates from Colombia.* Obtenido de IntJ Antimicrob Agents.: https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.04.002

Daikos G. et al., S. T. (2014). *Carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems*. Obtenido de Antimicrob Agents Chemother: https://doi.org/10.1128/AAC.02166-13

Dallenne C et al., A. D. (2010). Development of a set of multiplex PCR assays for the detectionof genes encoding important b-lactamases in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

Dalmolin T. et al., D. d.-M. (2018). *Plasmid-mediated Colistin Resistance: What Do We Know?* Obtenido de Journal of Infectiology: https://www.infectiologyjournal.com/articles/plasmidmediated-colistin-resistance-what-do-we-know.html

Davis M. et al, S. W. (2015). *Recent emergence of Escherichia coli with cephalosporin resistance conferred by blaCTX-M on Washington State dairy farms.* Obtenido de Appl. Environ. Microbiol.: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4475894/

De La Fuente et al, M. I. (2017). *Presence of intracellular Escherichia coli in patients with inflammatory bowel disease.* Obtenido de Revista médica de Chile: http://dx.doi.org/10.4067/s0034-98872017000901129

Del Bianco F. et al., M. M. (2018). *Microbiological surveillance of plasmid mediated colistin resistance in human Enterobacteriaceae isolates in Romagna (Northern Italy): August 2016–July 2017.* Obtenido de International Journal of Infectious Diseases: https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.02.006

di Conza J. et al., B. A. (2014). *â-lactamases produced by amoxicillin-clavulanate-resistant enterobacteria isolated in Buenos Aires Argentina: a new blaTEM gene.* . Obtenido de Rev Argent Microbiol : 10.1016/S0325-7541(14)70075-6

Dimitriu T. et al., L. M. (2019). *Bacteria from natural populations transfer plasmids mostly towards their kin*. Obtenido de Royal society publishing: https://doi.org/10.1098/rspb.2019.1110

Dominguez et al, J. E.-M. (06 de 03 de 2019). *Characterization of Escherichia coli Carrying mcr-1-Plasmids Recovered From Food Animals From Argentina*. Obtenido de Front. Cell. Infect. Microbiol: https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00041

Doumith M. et al, G. G.-P. (18 de 04 de 2016). *Detection of the plasmid-mediated mcr-1 gene conferring colistin resistance in human and food isolates of Salmonella enterica and Escherichia coli in England and Wales*. Obtenido de Journal of Antimicrobial Chemotherapy: https://doi.org/10.1093/jac/dkw093

E. Matuschek et al., J. C. (05 de 12 de 2017). *Antimicrobial susceptibility testing of colistin – evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, and Acinetobacter spp.* Obtenido de ELSEVIER: https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.11.020

EUCAST. (2017). *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters*. Obtenido de http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_7.1_Breakpoint_Tables.pdf.

EUCAST(2). (2016). *Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) as recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group.* Obtenido de EUCAST: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf.

Falgenhauer et al, S.-E. W. (09 de 2016). *Chromosomal Locations of mcr-1 and blaCTX-M-15 in Fluoroquinolone-Resistant Escherichia coli ST410*. Obtenido de Emergency Infect Diseases: 10.3201/eid2209.160692

Fernandes et al, Q. M. (28 de 04 de 2016). *Silent dissemination of colistin-resistant Escherichia coli in South America could contribute to the global spread of the mcr-1 gene* . Obtenido de Eurosurveillance: https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.17.30214

Fica A. (2014). *Antibiotic resistance among gramnegative bacilli, grampositive bacteria and anaerobes. Therapeutic implications*. Obtenido de REV. MED. CLIN. CONDES: https://www.clinicalascondes.cl/Dev_CLC/media/Imagenes/PDF%20revista%20m%C3%A9dica/2014/3%20abril/7-Dr.Fica.pdf

García et al., I. G.-B.-S.-J. (01 de 07 de 2018). *Co-occurrence of mcr-1, mcr-4 and mcr-5 genes in multidrug-resistant ST10 Enterotoxigenic and Shiga toxin-producing Escherichia coli in Spain (2006-2017)*. Obtenido de International Journal of Antimicrobial Agents: https://www.clinicalkey.es/#!/content/playContent/1-s2.0-S0924857918301006?returnurl=https:%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0924857918301006%3Fshowall%3Dtrue&referrer=https:%2F%2Fwww.ncbi.nlm.nih.gov%2F

Gast M. et al., K. H. (2019). *Understanding the viral load during the synthesis and after rebinding of virus imprinted particles via real-time quantitative PCR*. Obtenido de Real society of Chemistry: https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2018/an/c8an00300a#!divAbstract

Giani T et al, S. S. (10 de 07 de 2018). *High prevalence of carriage of mcr-1-positive enteric bacteria among healthy children from rural communities in the Chaco region,*

Bolivia, September to October 2016. Obtenido de Euro Surveillance : https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.45.1800115

Gomes et al, W. P. (12 de 2016). *Diarreogénicos Escherichia coli*. Obtenido de Revista Brasileña de Microbiología: https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015

Gómez O, -D. O. (02 de 05 de 2014). *Enfermedad diarreica aguda por Escherichia coli*. Obtenido de Vanderbilt University School of Medicine: https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v31n5/art10.pdf

Gómez, -D. O. (02 de 05 de 2014). *Enfermedad diarreica aguda por Escherichia coli*. Obtenido de Vanderbilt University School of Medicine: https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v31n5/art10.pdf

Gua et al., D.-x. (2016). *Detection of Colistin Resistance Gene mcr-1 in Hypervirulent Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli Isolates from an Infant with Diarrhea in China.* Obtenido de Antimicrobial Agents and Chemotherapy: doi:10.1128/AAC.00476-16.

Guiral E et al, E. M.-A. (10 de 2011). *CTX-M-15–producing Enteroaggregative Escherichia coli as Cause of Travelers' Diarrhea*. Obtenido de Emerg Infect Diseases: 10.3201/eid1710.110022

Gurnee et al, E. A.-A.-M. (05 de 12 de 2015). *Colonización intestinal de niños sanos y sus madres con Escherichia coli patógena resistente a la ciprofloxacina*. Obtenido de The Journal of Infectious Diseases: https://doi.org/10.1093/infdis/jiv278

Gutiérrez M. & Sánchez C. (2017). *Detección y caracterización de Escherichia coli patógeno en carne de pollo por reacción en cadena de la polimerasa*. Obtenido de UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS : https://pdfs.semanticscholar.org/7941/a3bf3eace8f0dec34906d1e30c67ebc76b5a.pdf

Hammad A. et al, H. M.-E.-G. (2019). *Genomic features of colistin resistant Escherichia coli ST69 strain harboring mcr-1 on IncHI2 plasmid from raw milk cheese in Egypt.* Obtenido de Infect Genet Evol.: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31029792

Hasman et al., A. M. (10 de 12 de 2015). *Detection of mcr-1 encoding plasmid-mediated colistin-resistant Escherichia coli isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015.* Obtenido de Euro Surveillance: https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2015.20.49.30085#metrics_content

Hindler et al., H. J. (06 de 2013). *Colistin MIC Variability by Method for Contemporary Clinical Isolates of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli*. Obtenido de Journal of Clinical Microbiology: 10.1128/JCM.03385-12

Hu M. et al, J. G. (2016). *Crystal Structure of Escherichia coli originated MCR-1, a phosphoethanolamine transferase for Colistin Resistance*. Obtenido de Scientific Reports: https://www.nature.com/articles/srep38793

Hughes A. et al., K.-S. J. (2016). *Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides.* Obtenido de Drug Resist Updat.: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4720503/

Ingle D. et al., I. M.-B. (2018). *Dynamics of antimicrobial resistance in intestinal Escherichia coli from children in community settings in South Asia and sub-Saharan Africa*. Obtenido de Nature Microbiology: https://www.nature.com/articles/s41564-018-0217-4

Joaquín Gómez, E. G.-V.-T. (2015). Los betalactámicos en la práctica clínica. *Rev Esp Quimioter,* 1-9. Obtenido de Servicio Medicina Interna-Infecciosas Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca.

Kadri K. (2019). *Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications*. Obtenido de Intechopen: 10.5772/intechopen.86491

Kaiser G. (2019). *Horizontal Gene Transfer in Bacteria*. Obtenido de bio.libretexts: https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3A_Microbiology_(Kaiser)/Unit_2%3A_Bacterial_Genetics_and_the_Chemical_Control_of_Bacteria/3%3A_Bacterial_Genetics/3.1%3A_Horizontal_Gene_Transfer_in_Bacteria

Kintses B. et al., O. M. (2019). *Phylogenetic barriers to horizontal transfer of antimicrobial peptide resistance genes in the human gut microbiota*. Obtenido de Nat Microbiol: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6387620/

Knudsen P. et al., G. K. (2018). *Transfer of a bla CTX-M-1-carrying plasmid between different Escherichia coli strains within the human gut explored by whole genome sequencing analyses.* Obtenido de Sci. Rep.: 10.1038/s41598-017-18659-2

Kumar S et al, S. G. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Oxford ACADEMIC*.

Lahey Clinic. (2017). *ß-lactamase classification and amino acid sequences for TEM, SHV and OXAextended-spectrum and inhibitor resistant enzymes.* Obtenido de https://www.lahey.org/studies/

Laxminarayan R. & Chaudhury R. (2016). *Antibiotic resistance in India: drivers and opportunities for action.* Obtenido de PLoS Med: https://doi.org/10.1371%2Fjournal.pmed.1001974

Lei L. et al., Y. W. (2017). *mcr-1 in Enterobacteriaceae from Companion Animals, Beijing, China, 2012–2016.* Obtenido de Emerg Infect Dis: 10.3201/eid2304.161732

Li Q. et al, W. C. (2019). *The Role of Plasmids in the Multiple Antibiotic Resistance Transfer in ESBLs-Producing Escherichia coli Isolated From Wastewater Treatment Plants*. Obtenido de Frontiers: https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00633

Liassine N. et al, A. M. (2016). *Very low prevalence of MCR-1/MCR-2 plasmid-mediated colistin resistance in urinary tract Enterobacteriaceae in Switzerland*. Obtenido de Int J Infect Dis: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971216311353

Liu Y. et al, Y.-Y. W.-X.-F. (18 de noviembre de 2016). *Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism mcr-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study*. Obtenido de The Lancet Infectious Diseases: http://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(15)00424-7/fulltext

Lo-Ten-Foe J. et al, A. M. (2007). *Comparative Evaluation of the VITEK 2, Disk Diffusion, Etest, Broth Microdilution, and Agar Dilution Susceptibility Testing Methods for Colistin in Clinical Isolates, Including Heteroresistant Enterobacter cloacae and Acinetobacter baumannii Strains*. Obtenido de Antimicrob Agents Chemother: 10.1128/AAC.01406-06

Luo Q. et al., W. Y. (2017). *Molecular Epidemiology and Colistin Resistant Mechanism of mcr-Positive and mcr-Negative Clinical Isolated Escherichia coli*. Obtenido de Front Microbiol.: 10.3389/fmicb.2017.02262

M. Urrestarazu et al, F. L.-S. (2009). *Características etiológicas, clínicas y sociodemográficas de la diarrea aguda en Venezuela*. Obtenido de Revista Panamericana de Salud Pública: https://www.scielosp.org/article/rpsp/1999.v6n3/149-156/

MacLaren G & Spelman D. (07 de 02 de 2018). *Polymyxins: An overview*. Obtenido de UpToDate: https://www.uptodate.com/contents/polymyxins-an-overview

Mardis E. (2011). *A decade's perspective on DNA sequencing technology*. Obtenido de Nature: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21307932

Maris S Arcilla, J. M. (17 de 12 de 2015). *Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene.* Obtenido de The Lancet Infectious Diseases: https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00541-1

Martínez P.et al., S. L. (2014). *Carbapenemase KPC-2 in ESBL-producingEnterobacteriaceae from two clinics from Villavicencio, Colombia.* Obtenido de Braz J Infect Dis: https://doi.org/10.1016/j.bjid.2013.09.002

May M. (2019). *Deciding on a PCR Detection Method*. Obtenido de Lab Manager : https://www.labmanager.com/product-focus/2019/06/deciding-on-a-pcr-detection-method

Medina et al, P. D. (09 de 2017). *Actualización acerca de colistina (polimixina E): aspectos clínicos, PK/PD y equivalencias*. Obtenido de Revista Médica del Uruguay: http://dx.doi.org/10.29193/rmu.33.3.5

Melgarejo et al., T. N. (Junio de 2018). *Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene mcr-1 in Enterobacteriaceae in Paraguay.* Obtenido de Rev. Salud Pública Paraguay: www.ins.gov.py/revistas/index.php/rspp/article/download/507/404

Melina Rapoporta, D. F. (07 de 2016). *First Description of mcr-1-Mediated Colistin Resistance in Human Infections Caused by Escherichia coli in Latin America.* Obtenido de Antimicrobial Agents and Chemotherapy: 10.1128/AAC.00573-16

Mendes V. et al, M. C. (2019). *Plasmid-mediated colistin resistance in Latin America and Caribbean: A systematic review*. Obtenido de Travel Medicine and Infectious Disease: https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2019.07.015

Mendes V. et al., M. C. (2019). *Plasmid-mediated colistin resistance in Latin America and Caribbean: A systematic review*. Obtenido de Travel Medicine and Infectious Disease: https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2019.07.015

Metzker M. (2010). *Sequencing technologies - the next generation.* Obtenido de Nature Genetics: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19997069

Miranda, G. M. (12 de 2013). *Extended spectrum beta-lactamase - positive Escherichia coli. Resistance*. Obtenido de Sanidad Militar: http://dx.doi.org/10.4321/S1887-85712013000400003

Momin A. et al., B. D. (2017). *CHROMagar COL - APSE: un medio de cultivo bacteriano selectivo para el aislamiento y la diferenciación de patógenos gramnegativos resistentes a la colistina.* Obtenido de Journal of Medical Microbiology: https://doi.org/10.1099/jmm.0.000602

Moremi et al, N. H. (12 de 09 de 2017). *Faecal carriage of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae among street children dwelling in Mwanza city, Tanzania*. Obtenido de PLoS One: 10.1371/journal.pone.0184592

Mosquito S. et al., J. R. (09 de 11 de 2011). *Molecular mechanisms of antibiotic resistance in Escherichia coli- associated diarrhea.* Obtenido de Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública: https://www.scielosp.org/scielo.php?pid=S1726-46342011000400013&script=sci_arttext

MR Fernandes, Q. M. (2016). *Authors' reply: Escherichia coli harbouring mcr-1 gene isolated from poultry not exposed to polymyxins in Brazil.* Obtenido de Euro Surveillance: http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.26.30268

MSP Ecuador, O. (19 de 02 de 2019). *Ecuador prohíbe el uso del antibiótico colistina para uso o consumo animal*. Obtenido de Redaccion Medica: https://www.redaccionmedica.ec/secciones/salud-publica/ecuador-prohibe-el-uso-del-antibiotico-colistina-para-uso-o-consumo-animal-93690

Mullis, K. (1990). *The unusual origin of the polymerase chain reaction.* Obtenido de Scientific American:

https://pdfs.semanticscholar.org/14bf/9cc89c9885d7ad46a384d0e5661ac07c752f.pdf

Nordmann P. et al., J. A. (2018). *A universal culture medium for screening polymyxin-resistant gram-negative isolates.* . Obtenido de Journal of Clinical Microbiology,: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4844728/pdf/zjm1395.pdf.

Ocampo A. et al., V. C. (2015). *199 Biomédica 2019;39(Supl.1):199-220Betalactamasas en bacterias Gram negativas en Colombia Distribución y caracterización molecular debetalactamasas en bacterias Gram negativas enColombia, 2001-2016 Ana Mercedes Rada1,2, Christian Hernández-Gómez3, Elian*. Obtenido de Biomédica: https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i4.2610

OIE. (2016). *Organización Mundial de la Salud Animal*. Obtenido de Manejo adecuado de los antibióticos: http://www.oie.int/esp/session2017/pdf/E_IF_2016.pdf

OPS/OMS, O. P. (10 de junio de 2016). *PAHO*. Obtenido de Alerta Epidemiológica: Enterobacterias con resistencia transferible a colistina, implicaciones para la salud publica en las Américas: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=35008&lang=es

Ortega D et al., M. H.-G.-B.-M. (2019). *Multi-drug resistant Escherichia coli isolated from canine feces in a public park in Quito, Ecuador*. Obtenido de Journal of Global Antimicrobial Resistance: https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.04.002

Ortega D. et al. (2016). *Colistin-resistant Escherichia coli clinical isolate harbouring the mcr-1 gene in Ecuador*. Obtenido de Epidemiology and Infection: DOI 10.1017/S0950268816001369

Ortega P. et al., B. P. (2016). *Colistin-resistant Escherichia coli clinical isolate harbouring the mcr-1 gene in Ecuador*. Obtenido de Epidemiology and Infection: DOI 10.1017/S0950268816001369

Osei J., S. (04 de 07 de 2018). *Mcr colistin resistance gene: a systematic review of current diagnostics and detection methods.* Obtenido de MicrobiologyOpen: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mbo3.682

Osei O., J. (2018). *Mcr colistin resistance gene: a systematic review of current diagnostics and detection methods*. Obtenido de MicrobiologyOpen: https://doi.org/10.1002/mbo3.682

Partridge S. et al., V. D.-S.-H.-K. (2018). *Proposal for assignment of allele numbers for mobile colistin resistance (mcr) genes*. Obtenido de Journal of Antimicrobial Chemotherapy,: https://doi.org/10.1093/jac/dky262

Quiroga C. et al, M. N. (03 de 2019). *Current scenario of plasmid-mediated colistin resistance in Latin America*. Obtenido de Asociación Argentina de Microbiología: https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.05.001

Rada A. et al., C. H.-G. (2019). *Distribución y caracterización molecular debetalactamasas en bacterias Gram negativas enColombia, 2001-2016*. Obtenido de Biomédica: https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4351

Rebelo et al., B. V.-G. (08 de 02 de 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.* Obtenido de Eurosurveilance: https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672

Reid C. et al., C. P. (2015). *Tn6026 and Tn6029 are found in complex resistance regions mobilised by diverse plasmids and chromosomal islands in multiple antibiotic*

resistant Enterobacteriaceae. Obtenido de Plasmid : https://doi.org/10.1016%2Fj.plasmid.2015.04.005

Renaloa. (2011). *Análisis microbiológico de los alimentos*. Obtenido de ANMAT: http://www.anmat.gov.ar/renaloa/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_Vol_I.pdf

Rivera-Jacinto et al., M. ,.-U. (2015). *Betalactamasas de espectro extendido tipo TEM y CTX-M en Klebsiella spp y Escherichia coli aisladas de superficies de ambientes hospitalarios.* Obtenido de Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342015000400018

Roer et al., H. F. (03 de 08 de 2017). *Novel mcr-3 variant, encoding mobile colistin resistance, in an ST131 Escherichia coli isolate from bloodstream infection.* Obtenido de Euro Surveill: 22846

Rojas L. et al., M. M. (2013). *Emergence of Klebsiella pneumoniae coharboring KPC and VIM carbapenemases inColombia.* . Obtenido de Antimicrob Agents Chemother.: https://doi.org/10.1128/AAC.01666-12

Rolain, J.-M. (24 de 06 de 2013). *Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes.* Obtenido de Frontiers in Microbiology: 10.3389/fmicb.2013.00173

Rossolini et al., D. C. (Enero de 2008). *The spread of CTX-M-type extended-spectrum β-lactamases.* Obtenido de Clinical Microbiology and Infection: https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01867.x

Russo J, H. A. (2017). *Metabolic labeling and recovery of nascent RNA to accurately quantify mRNA stability.* Obtenido de Methods.: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28219744

Saavedra S. et al, L. D. (22 de 11 de 2017). *Genomic and Molecular Characterization of Clinical Isolates of Enterobacteriaceae Harboring mcr-1 in Colombia, 2002 to 2016*. Obtenido de American Society for Microbiology Journals: https://doi.org/10.1128/AAC.00841-17

Sani et al, S. S. (10 de 08 de 2018). *Integral detection of bacterial macromolecules: applications of nucleic acid-based approaches*. Obtenido de Biointerface Research in Applied Chemistry: https://www.researchgate.net/profile/Seyed_Mahdi_Hosseiniyan_Khatibi/publication/327163212_Integral_detection_of_bacterial_macromolecules_Applications_of_nucleic_acid-based_approaches/links/5b7da5de4585151fd127c2ce/Integral-detection-of-bacterial-macromol

Shah M. et al. (2016). *Prevalence, seasonal variation, and antibiotic resistance pattern of enteric bacterial pathogens among hospitalized diarrheic children in suburban regions of central Kenya.* Obtenido de Trop. Med. Health: https://doi.org/10.1186%2Fs41182-016-0038-1

Shaikh S. et al., F. J. (2015). *Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment.* Obtenido de Saudi J Biol Sci.: https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.08.002

Smith et al., M. C. (26 de 05 de 2016). *U.S. Department of Health Service and Human Services (HHS.* Obtenido de Proactive efforts by U.S. Federal agencies enable early detection of new antibiotic resistance. U.S.: http://www.hhs.gov/blog/2016/05/26/early-detection-new-antibiotic-resistance.html

Soto Z. et al, L. P. (2016). *Bacteria causing of foodborne diseases:*. Obtenido de Salud Uninorte: http://www.scielo.org.co/pdf/sun/v32n1/v32n1a10.pdf

Stein L. (2010). *The case for cloud computing in genome informatics.* Obtenido de Genome Biology: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20441614

Sun J. et al, H. Z.-H. (2018). *Towards Understanding MCR-like Colistin Resistance.* Obtenido de Trends in Microbiology: https://www.clinicalkey.es/#!/content/playContent/1-s2.0-S0966842X18300428?returnurl=https:%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0966842X18300428%3Fshowall%3Dtrue&referrer=

Tadesse D. et al, C. L.-H. (01 de 09 de 2018). *Whole-Genome Sequence Analysis of CTX-M Containing Escherichia coli Isolates from Retail Meats and Cattle in the United States*. Obtenido de Microbial Drug Resistance: https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0206

Terveer et al, E. M. (02 de 06 de 2017). *Prevalence of colistin resistance gene (mcr-1) containing Enterobacteriaceae in feces of patients attending a tertiary care hospital and detection of a mcr-1 containing, colistin susceptible E. coli*. Obtenido de PlosOne: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178598

Tijet N. et al, D. F. (05 de 07 de 2017). *Molecular characteristics of mcr-1-carrying plasmids and new mcr-1 variant recovered from polyclonal clinical Escherichia coli from Argentina and Canada*. Obtenido de Plos One: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180347

Tran T. et al, V. T. (2016). *Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistín and polymixin B: are we yet?.* Obtenido de Int J Antimicrob Agents: 10.1016/j.ijantimicag.2016.09.010

Tsuji B. et al, J. M. (02 de 02 de 2019). *International Consensus Guidelines for the Optimal Use of the Polymyxins Endorsed by the American College of Clinical Pharmacy (ACCP), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*

(ESCMID), Infectious Diseases Society of America (IDSA. Obtenido de The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy: https://doi.org/10.1002/phar.2209

Turlej-Rogacka A. et al, B. B.-K. (2018). *Evaluation of colistin stability in agar and comparison of four methods for MIC testing of colistin*. Obtenido de Eur J Clin Microbiol Infect Dis: 10.1007/s10096-017-3140-3

Ugarte R. et al, J. M. (2018). *Resistencia a colistín mediado por el gen mcr-1 identificado en cepas de Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae. Primeros reportes en el Perú*. Obtenido de An Fac med: http://dx.doi.org/10.15381/anales.

Vanegas J. et al., P. O. (2016). *Molecular epidemiology of carbapenem resistantgram-negative bacilli from infected pediatric population in tertiary - care hospitals inMedellín, Colombia: An increasing problem.* . Obtenido de BMC Infect Dis: https://doi.org/10.1186/s12879-016-1805-7

Vargas E. et al., R. S. (2016). *The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean*. Obtenido de Expert Rev Anti Infect Ther: https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1268918

Verraes C. et al., S. V. (2013). *Antimicrobial Resistance in the Food Chain: A Review.* Obtenido de International Journal of Infectious Diseases: https://doi.org/10.3390/ijerph10072643

Vidal Group. (2014). *Vidal Group Drug Information Systems. Colistiméthate sodique: mise à jour 24 Avril 2014.* Obtenido de https://www.vidal.fr/substances/3936/colistimethate_sodique/.

Vidal, V. S. (03 de 06 de 2017). *Polimixinas, Colistina*. Obtenido de Vademecum: https://www.vademecum.es/principios-activos-colistina-j01xb01

Vinh N. et al, S. M.-M. (03 de 2017). *Zoonotic Transmission of mcr-1 Colistin Resistance Gene from Small-Scale Poultry Farms, Vietnam*. Obtenido de Emerging Infectious Diseases: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/23/3/16-1553_article

Vivanco M, F. P. (2016). *Incidencia del uso de antimicrobianos en la producción de alimentos para el consumo humano*. Obtenido de PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR: http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/11469/MONOGRAF%C3%8DA%20MONICA%20VIVANCO.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Wang et al, G.-B. T.-Y.-L.-J.-H. (01 de 04 de 2017). *Prevalence, risk factors, outcomes, and molecular epidemiology of mcr-1 -positive Enterobacteriaceae in patients and healthy adults from China: an epidemiological and clinical study*. Obtenido de Lancet Infectious Diseases: https://www.clinicalkey.es/#!/content/playContent/1-s2.0-S1473309916305278?returnurl=https:%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1473309916305278%3Fshowall%3Dtrue&referrer=

Wang X. et al, Y. W. (04 de 07 de 2018). *Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, mcr-8, in NDM-producing Klebsiella pneumoniae*. Obtenido de Emerg Microbes Infect: 10.1038/s41426-018-0124-z

Wang X. et al., Y. W. (2018). *Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, mcr-8, in NDM-producing Klebsiella pneumoniae*. Obtenido de Emerging Microbes & Infections: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1038/s41426-018-0124-z

Wetterstrand K. (2019). *DNA Sequencing Costs: Data*. Obtenido de National Human GEnome Research Institute: https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/DNA-Sequencing-Costs-Data

Wise et al, M. G. (02 de 04 de 2018). *Prevalence of mcr-type genes among colistin-resistant Enterobacteriaceae collected in 2014-2016 as part of the INFORM global surveillance program*. Obtenido de PLOSIONE: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195281

Xavier BB, L. C.-S.-K. (07 de 07 de 2016). *Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in Escherichia coli, Belgium, June 2016.* Obtenido de Euro Surveillevance: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.27.30280.

Xavier et al., L. C.-S. (2016). *Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in Escherichia coli, Belgium, June 2016.* Obtenido de Eurosurveillance: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.27.30280.

Yamamoto Y. et al., M. C. (2019). *Colistin-resistant Escherichia coli with mcr genes in the livestock of rural small-scale farms in Ecuador*. Obtenido de BMC Res Notes: 10.1186/s13104-019-4144-0

Yang F. et al., C. S.-G.-S.-B. (2019). *Plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-1 in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolated from market retail fruits in Guangzhou, China*. Obtenido de Infect Drug Resist.: 10.2147/IDR.S194635

Yang Y. et al., Y.-X. L.-W.-Y.-N. (2018). *Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-7.1 in Klebsiella pneumoniae*. Obtenido de Journal of Antimicrobial Chemotherapy: https://doi.org/10.1093/jac/dky111

Yin W et al, a. H. (27 de june de 2017). *Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene mcr-3 in Escherichia coli*. Obtenido de American Society for Microbiology: http://mbio.asm.org/content/8/3/e00543-17.full.pdf+html

Yi-Yun L. et al., Y. W.-X.-F. (2016). *Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study*. Obtenido de CLinicalKey:

https://www.clinicalkey.es/#!/content/playContent/1-s2.0-S1473099150042 47?returnurl=https:%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1473099150042 47%3Fshowall%3Dtrue&referrer=https:%2F%2Fwww.ncbi.nlm.nih.gov%2F&scrollTo=%23tbl2

Yi-Yun Liu BS, Y. W.-X.-F. (2016). *Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study*. Obtenido de CLinicalKey: https://www.clinicalkey.es/#!/content/playContent/1-s2.0-S1473099150042 47?returnurl=https:%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1473099150042 47%3Fshowall%3Dtrue&referrer=https:%2F%2Fwww.ncbi.nlm.nih.gov%2F&scrollTo=%23tbl2

Zamani et al., K. A. (Agosto de 2015). *Caracterización fenotípica y molecular de aislados de Escherichia coli productores de beta-lactamasa de espectro extendido CTX-M en Shiraz, Irán.* Obtenido de Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical: http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0315-2014

Zhang (3) et al, D. Y. (09 de 2016). *Possible Transmission of mcr-1–Harboring Escherichia coli between Companion Animals and Human*. Obtenido de Emerging Infectious Deseases: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/22/9/16-0464_article

Zhang et al., J. (20 de 02 de 2018). *Molecular detection of colistin resistance genes (mcr-1 to mcr-5) in human vaginal swabs.* Obtenido de BMC Research Notes, 11: 10.1186/s13104-018-3255-3

Zhang et al., J. Z. (20 de 02 de 2018). *Molecular detection of colistin resistance genes (mcr-1 to mcr-5) in human vaginal swabs.* Obtenido de BMC Research Notes: 10.1186/s13104-018-3255-3

Zhang R (2) et al, Y. H.-c. (01 de 03 de 2016). *Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene* . Obtenido de ELSEVIER: https://www.clinicalkey.es/#!/content/playContent/1-s2.0-S1473309916000621?returnurl=https:%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1473309916000621%3Fshowall%3Dtrue&referrer=https:%2F%2Fwww.eurosurveillance.org%2Fcontent%2F10.2807%2F1560-7917.ES

Zhangqi Shen, Y. W. (March de 2016). *Early emergence of mcr-1 in Escherichia coli from food-producing animals.* Obtenido de The Lancet Infectious Diseases: https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00061-X

Zheng B. et al., H. C. (2017). *Occurrence and Genomic Characterization of ESBL-Producing, MCR-1-Harboring Escherichia coli in Farming Soil.* Obtenido de Front Microbiol.: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29312211/

Zilberberg M. et al., B. H. (2017). *Carbapenem resistance, inappropriate empiric treatment and outcomes among patients hospitalized with Enterobacteriaceae urinary tract infection, pneumonia and sepsis*. Obtenido de BMC Infectious Diseasesvolume: https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-017-2383-z

Zurfluh K et al, R. S.-J.-I. (14 de 03 de 2017). *Screening for fecal carriage of MCR-producing Enterobacteriaceae in healthy humans and primary care patients*. Obtenido de Antimicrobial Resistance & Infection Control: https://aricjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13756-017-0186-z

ANEXOS

Anexo 1. Materiales, reactivos y equipos del laboratorio.

Reactivos, Agares y otros	**Materiales**	**Equipos**
- MacConkey - TBX Agar BD - TE 1X - Agarosa - Green Taq - Ladder 100pb - Primers reverse 1,2,3,4 y 5 *mcr* - Primers forward 1,2,3,4 y 5 *mcr* - Bromuro de etidio - PCR kit	- Cajas mono Petri - Asas calibradas - Tubos Eppendorf de 2 ml - Tubos Eppendorf de 1 ml - Guantes de manejo - Gradillas - Tubos de vidrio de 10 ml	- Termociclador BioRad C-1000 - Termomixer - Pipetas automáticas - Centrifuga - Incubadora

Anexo 2. Autorización por parte del INSPI-Quito

Pontificia Universidad Católica del Ecuador
Facultad de Medicina,
Carrera de Bioquímica Clínica

PUCE

Quito 30 de agosto de 2018

Dra. Mayra Beatriz Wilca Pumagualli
Coordinadora
Zonal 9 del Instituto de Investigación en Salud Publica "Dr. Leopoldo Izquieta Pérez"
INSPI - LIP

De mi consideración. –

Por medio de la presente solicito a usted autorice la realización del proyecto de investigación en colaboración con el Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos – Proyecto AGISAR, el cual será realizado por el estudiante:

- Sr. Kenny Alejandro De La Torre Sánchez con CI: 171816675-2, preplan para el Trabajo de Titulación intitulado: *"Determinación de la presencia del gen mcr y sus variantes presentes en Escherichia coli aisladas de muestras fecales de pacientes captados en el Centro de Salud Tipo C de Guamaní en Quito en el 2018"*

El trabajo se realizará con aislados de *Escherichia coli* provenientes de muestras de heces fecales de pacientes con diagnóstico presuntivo de gastroenteritis; que acuden a emergencias del Centro de Salud Tipo C de Guamaní, para lo cual autorice el uso de las instalaciones y muestras de heces obtenidas por el INSPI como parte del Proyecto AGISAR. La relación entre el instituto y el tesista no implica un vínculo laboral y es netamente de formación académica sin remuneración alguna.

Por lo anteriormente señalado solicito a usted su colaboración para que los estudiantes realicen el trabajo de titulación y el oficio correspondiente a este pedido. Seguro de contar con su colaboración a esta actividad académica de beneficio para la comunidad y de relevancia científica para las dos instituciones anticipo mi agradecimiento.

Atentamente Septiembre 2018 – Marzo 2019

Dr. Francisco Pérez Pazmiño
Decano de la Facultad de Medicina

Pontificia Universidad Católica del Ecuador FACULTAD DE MEDICINA DECANO QUITO

Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI ESPACHO QUITO

INSPI - LIP ESPACHO QUITO

31-08-18 14:23

Entregado 05/09/2018

Recibido 06-sep-2018 GIDi-EpiSIG

Av. 12 de Octubre 1076 y Ramón Roca
Apartado postal 17-01-2184
Telf.: (593) 2 299 17 00
Quito – Ecuador www.puce.edu.ec

Anexo 3. Aprobación del CEISH INSPI LIP.

Notificación de la revisión del Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos (CEISH) del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública –Leopoldo Izquieta Pérez (INSPI-LIP)

Para: Eduardo Villacís Msc.

Título del Protocolo: "Prevalencia y resistencia antimicrobiana de *Campylobacter, Salmonella* y *E. coli* ESBL en granjas avícolas, carne de aves de corral y casos de gastroenteritis humanos de octubre 2017 a julio 2018 en el Distrito Metropolitano de Quito."
Protocolo #: CEISH-INSPI-005
Versión: 2 (Modificaciones al Protocolo de Investigación)
Fecha de resolución: 5 de Octubre del 2017
Resolución: APROBADO

Por medio de la presente se certifica que el estudio de investigación, "**Prevalencia y resistencia antimicrobiana de *Campylobacter, Salmonella* y *E. coli* ESBL en granjas avícolas, carne de aves de corral y casos de gastroenteritis humanos de octubre 2017 a julio 2018 en el Distrito Metropolitano de Quito.**", fue revisado por el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos (CEISH) del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública –Leopoldo Izquieta Pérez (INSPI-LIP).

Los miembros del CEISH del INSPI LIP dictaminan que una vez efectuada la evaluación del protocolo mediante una reunión ordinara el día 20 de septiembre del 2017, donde se emitió la *aprobación condicionada a modificaciones*, y así mismo que luego de haber receptado y aprobado todas las modificaciones solicitadas emiten su resolución final de **APROBADO.**

Cabe mencionar que la aprobación emitida mediante este documento comprende el período de duración prevista para la investigación en cuestión. Asimismo se le informa que, todo promotor e investigador está en la obligación de reportar cualquier evento adverso grave (esperado o no esperado) al CEISH del INSPI-LIP. En caso de existir, se realizará el seguimiento de los eventos adversos graves con el investigador principal para garantizar la seguridad de los pacientes. Con este fin se podrán solicitar los informes necesarios, en caso de presentarse eventos adversos graves o inesperados.

Avisos importantes:
- No realice modificaciones al protocolo una vez este haya sido aprobado.
- Si se requieren cambios adicionales, estos deben ser presentados como una enmienda.

Sin más por añadir y en caso de requerir información adicional diríjalas al CEISH del INSPI-LIP, a la dirección: Calle Iquique N14-285 y Yaguachi, Sector el Dorado. Puede encontrar información adicional en el sitio web del CEISH, http://www.investigacionsalud.gob.ec/webs/ceish/, o de manera directa a su Secretaria, Natalia Carrión, al email ncarrion@inspi.gob.ec.

Cordialmente,



Ana Lucía Ruano Phd.
Presidenta del Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos (CEISH) del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública-Leopoldo Izquieta Pérez (INSPI-LIP)

6 de Octubre del 2017
Fecha de Correspondencia

Anexo 4. Autorización de la Dirección Nacional de Inteligencia Para La Salud

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA

Coordinación General de Desarrollo Estratégico en Salud
Dirección Nacional de Inteligencia de la Salud

Oficio Nro. MSP-DIS-2017-0192-O

Quito, D.M., 14 de diciembre de 2017

Asunto: Evaluación del Estudio Observacional MSPCURI000234-5

Señora Doctora
Tania Jacqueline Mori Lucero, Mgs.
Directora Ejecutiva INSPI.(Encargada)
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA - INSPI - DR. LEOPOLDO IZQUIETA PÉREZ
En su Despacho

De mi consideración:

En respuesta al Oficio Nro. INSPI-2017-1235-OFI Guayaquil, 08 de diciembre de 2017 emitido por la Dra. Tania Mori; y en alcance al oficio Nro.19555 con fecha 11 de diciembre del año en curso emitido por el Investigador Principal Christian Burgos; una vez evaluado el protocolo del estudio observacional titulado: " *Prevalencia y resistencia antimicrobiana de Campylobacter, Salmonella y E. coli ESBL en granjas avícolas, carne de aves de corral y casos de gastroenteritis humanos de diciembre 2017 a julio 2019 en el distrito Metropolitano de Quito"*, codificado por la Dirección Nacional de Inteligencia de la Salud como: MSPCURI000234-5 y una vez cumplidos los requisitos mínimos para la evaluación del mismo, efectuando además con las sugerencias realizadas por la Dirección Nacional de Inteligencia de la Salud y la Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica, se **APRUEBA** la versión adjunta del protocolo y se remite informe técnico.

Le recordamos que una vez finalizada la investigación, es responsabilidad del investigador principal enviar a esta Dirección y a la Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica los resultados de la misma; así como las publicaciones que se realicen como producto de este estudio.

La Dirección Nacional de Inteligencia de la Salud, aprueba los protocolos de los estudios observacionales en el ámbito de sus competencias, en base a una revisión de la calidad metodológica y ética de los estudios. Sin embargo, el contenido, la autoría y la responsabilidad sobre los resultados del estudio corresponden al investigador principal. Cabe mencionar que si bien los resultados podrían contribuir a la salud pública, éstos no son de carácter vinculante para esta Cartera de Estado.

Con sentimientos de distinguida consideración.

Oficio Nro. MSP-DIS-2017-0192-O

Quito, D.M., 14 de diciembre de 2017

Atentamente,

Documento firmado electrónicamente

Med. Ronny Alejandro De La Torre Cevallos
DIRECTOR NACIONAL DE INTELIGENCIA DE LA SALUD

Referencias:
- MSP-DIS-2017-0028-E

Anexos:
- proyecto_agisar_inspi_crnram.pdf
- protocolo0162532001513272978.pdf
- informe_mspcuri000234-50513216001513274567.pdf

Copia:
Señorita Ingeniera
Carolina Estefania Echeverria Andrade
Especialista de Investigación y Análisis 1

Señora Magíster
Miriam del Rocio Obando Rodriguez
Analista de la Dirección Nacional de Inteligencia

Señorita Técnica
Laura Mercedes Torres Heredia
Asistente de la Coordinación General de Desarrollo Estratégico en Salud

Señora Magíster
Mayling Desiree Encalada Díaz
Directora Nacional de Vigilancia Epidemiológica

Señora Magíster
Carmen Tatiana Guerrero Díaz
Coordinadora Zonal 9 - Salud

Señorita Licenciada
María Cristina Cadena Ponce
Directora Distrital de Salud 17D02

Señor Doctor
José Patricio Galarraga Garces
Director Distrital de Salud 17D07

Señor
Christian Vinicio Vinueza Burgos

Oficio Nro. MSP-DIS-2017-0192-O

Quito, D.M., 14 de diciembre de 2017

mo

Anexo 5. Consentimiento Informado Proyecto AGISAR – INSPI

Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública

Consentimiento Informado

Título de la investigación: Prevalencia y resistencia antimicrobiana en *Campylobacter*, *Salmonella* y *E. coli* ESBL, en granjas avícolas, carne de aves de corral y casos de gastroenteritis en humanos de octubre 2017 a julio de 2018 en el Distrito Metropolitano de Quito.

Versión y Fecha: Versión #1, 20 de noviembre 2017

Centro de Investigación: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Central del Ecuador, Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública.

Investigador Principal: *Dr. Christian Vinueza, M.Vet.Sci, M.Tro.Ani.H. PhD*

Información y contactos: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Unidad de Investigación de Enfermedades Transmitidas por Alimentos y Resistencias a los Antibióticos (UNIETAR)

Universidad Central del Ecuador, Gerónimo y Gato Sobral Tel. (+593) 999831304

E-mail**:** cvinueza@uce.edu.ec

Co-investigador: MSc José Eduardo Villacis Acuña., responsable del Centro de Referencia Nacional de Resistencia Antimicrobiana, T: (+593) 02552715 / (+593) 02509625

1. Introducción

Usted ha sido invitado a participar en esta investigación que tiene por objetivo comprender cómo las enfermedades causadas por microorganismos en pollos pueden ser transmitidas a los seres humanos y causar gastroenteritis. Si usted quiere participar, puede tomarse un tiempo para decidir con su familia si desea o no participar. Este formulario incluye un resumen de la información que los investigadores quieren compartir con

usted. Si decide participar en este estudio, usted recibirá una copia de este documento. Por favor haga todas las preguntas que desee para comprender bien la propuesta de este estudio.

2. ¿Cuál es la propuesta de este estudio?

Este es un proyecto de investigación de La Universidad Central del Ecuador y el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública que tiene por objetivo entender cómo las enfermedades causadas por microorganismos en pollos pueden ser transmitidos a los seres humanos. El objetivo general es mejorar la salud por medio de una mejora más efectiva y eficiente en la crianza de aves usadas para consumo y del sistema de vigilancia de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS) del sistema nacional de salud. Los objetivos de este estudio son determinar si los microorganismos que más comúnmente portan las aves son transmitidos y causantes de gastroenteritis en los seres humanos. Caracterizar las prácticas de manejo en la producción de aves de corral que permiten la transmisión de enfermedades causadas por microorganismos a las personas y mejorar el sistema de vigilancia de las ETAS.

3. ¿Existen beneficios para usted, como participante y/o para la comunidad?

Se realizarán análisis de laboratorio de las heces de su persona o hijos (coproparasitarios y bacteriológicos) y se le entregarán los resultados dentro de 15 días desde la fecha de entrega de la muestra siempre que estas se encuentren dentro de los criterios de inclusión del estudio, es decir que cumplan con ciertos requerimientos emitidos por el personal de laboratorio capacitado para ello.

4. ¿Cuánta gente estará participando en este estudio?

300 personas mayores de 2 años que vivan en el Distrito Metropolitano de Quito.

5. ¿Cómo se llevará a cabo este estudio?

Primero, le voy a leer el formulario de consentimiento, luego le haré un cuestionario que tiene que responder oralmente. Luego le pediremos que nos permita usar para el estudio la muestra de heces frescas suya o de su niño/a que fue llevada al centro de salud donde fue atendido. Nosotros analizaremos la muestra en busca de signos de exposición a bacterias provenientes de los pollos. Esto nos ayudará a encontrar si usted o su niño/a ha sido expuesto a estas bacterias y si fueron las causantes de la gastroenteritis.

6. ¿**Cuánto de mi tiempo necesita este estudio?**

La explicación del estudio tomará 5 minutos, y contestar la encuesta entre 5 minutos, un total de aproximadamente 10 minutos de su tiempo.

7. ¿Cuáles son los riesgos de participar en este estudio?

No existen riesgos por participar en esta encuesta, ni riesgos médicos para usted, su hijo o hija por participar en este estudio.

8. ¿La información de las muestras colectadas será confidencial?

Lo que hablemos con respecto a usted o su niño/a se mantendrá en privado, para proteger la privacidad de usted, su niño/a. Mantendremos los registros bajo un código en lugar de su nombre. Mantendremos los registros en un lugar seguro y solo el personal del estudio podrá usarlos. Su nombre o el de su niño/a, u otra información que pueda señalar a usted o a otros miembros de la familia no serán presentados en este estudio o resultados de la publicación.

El Comité de Bioética del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, es una entidad que tiene acceso a la información por seguridad y asuntos éticos para supervisar la seguridad de la investigación y su cumplimiento.

Solo la gente directamente involucrada con la investigación, que son Dr. Christian Vinueza y MSc. José Eduardo Villacis, sabrán su nombre.

- Su nombre no será mencionado o incluido en ninguna publicación o reporte.
- La información será guardada y almacenada de la siguiente manera: El cuestionario y todas las muestras serán rotulados con un código. Su nombre únicamente estará en el consentimiento informado que será guardado por separado. Su nombre no estará ni en el cuestionario ni en las muestras. Las muestras pueden ser almacenadas por 3 años después de su completo estudio. Esto quiere decir que se guardarán hasta que se hayan completado todos los análisis de laboratorio, incluyendo la investigación de otros tipos de microorganismos, de ser necesario. Las muestras se descartarán luego de 3 años después de que se haya completado el estudio a menos de que usted permita que los investigadores almacenen su muestra para futuros usos.

9. ¿Cuáles son sus opciones?

La participación en este estudio es voluntaria. Después de que haya escuchado toda la información, usted puede escoger si participa o no, o puede retirarse en cualquier momento durante la entrevista.

Si usted accede a participar, debe firmar 2 copias de este consentimiento. Una es para que usted la guarde; yo también firmaré en esa copia. El consentimiento tiene información acerca del estudio así como nuestros contactos. El otro formulario de consentimiento nos sirve para tener un registro de que usted accedió a ser parte de este estudio. Este será archivado en sobre sellado, separado de cualquier resultado del estudio. No existe un número en este consentimiento. Solo el Investigador Principal (Christian Vinueza, PhD) y el Co-Investigador (José Eduardo Villacís, MSc.) tendrán acceso a estos archivos.

10. ¿Cuánto tiene que pagar para participar en este estudio?

Usted no debe pagar por participar en este estudio.

11. ¿Usted recibirá algún pago por participar en este estudio?

Usted no recibirá ningún pago por haber participado en este estudio.

12. ¿Qué derechos tiene usted si participa en este estudio?

La participación en este estudio es voluntaria. Después de que usted haya escuchado toda la información leída, usted puede escoger no participar, o puede retirarse en cualquier momento de la entrevista.

13. ¿A quién debe llamar si tiene alguna pregunta o problema?

Si tiene alguna pregunta acerca de este estudio, por favor llame o envíe un e-mail a: Co-Investigador: MSc José Eduardo Villacis Acuña., responsable del Centro de Referencia Nacional de Resistencia Antimicrobiana, T: (+593) 02509625 (+593) 02552715

14. Consentimiento Informado:

Entiendo los riesgos y beneficios de mi participación en este estudio de investigación. He tenido suficiente tiempo para revisar este documento, y el lenguaje usado fue claro. Todas mis preguntas han sido respondidas y he recibido una copia del formulario de consentimiento informado.

Acepto que los investigadores usen mi muestra fecal o la de mi SI ( ) NO ( )

Hijo/a.

Permito que los investigadores almacenen la muestra de heces

para futuros estudios de diarreas: SI ( ) NO ( )

(A los padres/cuidador(a)) Me han explicado oralmente de qué se trata

el estudio y he contestado todas mis dudas y preguntas. Acepto que los

investigadores usen la muestra de las heces fecales para análisis SI ( ) NO ( )

Datos del Participante:

Nombres Completos del paciente:

Edad del paciente:

Nombres completos padre/madre o cuidador:

Número telefónico fijo y celular:

Dirección:

Género:

Por medio del presente acepto voluntariamente participar en este estudio firmando a continuación.

_____ _____

Firma del participante o representante legal (para menores) Fecha

Nombre del investigador que explicó el consentimiento informado: _____

_____ _____

Firma del investigador Fecha

Cuestionario Flash:

No.	PREGUNTA	RESPUESTA	CÓDIGO	SALTO
1	¿Qué alimento consumió antes de presentar el episodio de diarrea? ***Anotar específicamente el alimento consumido***	Qué alimento: _____ No responde: x		
2	¿Dónde consumió este alimento?	En casa: 1 Mercado:2 Restaurante:3 Otro: _____:4 No responde: x		
3	¿Consume carne? ¿Con que frecuencia a la semana?	Si: 1 No: 0 A veces:2 Anotar frecuencia: _____ No responde: x		
4	¿Qué tipo de carne?	Pollo:1		

		Carne:2 Pescado:3 Otra:4 Otros tipos de carne? : _____ No responde: x		
5	¿Dónde compra la carne?	Despensa del barrio: 1 Mercado:2 Supermercado:3 Criadero:4 Son mis propios animales:5 Otro: _____:6 No responde: x		
6	¿Posee animales en la casa?	Si: 1 No:0 No responde: x		
7	¿Qué tipo de animales?	Perros: 1 Gatos:2 Pájaros:3 Cerdos:4 Vacas:5		

		Ovejas: 6 Gallinas:7 (Colocar todas las especies animales encontradas en el hogar) Otro: _____ No responde: x		
8	¿Ha tomado antibióticos alguna vez? (EXPLICAR)	Si: 1 No: 0 No recuerda: 2 No responde: x		
9	¿Su médico le ha recetado los antibióticos?	Si: 1 No: 0 No recuerda: 2 No responde: x		
10	¿Recuerda cuándo fue la última vez que tomo antibióticos? y ¿cómo se llamaban?	Si: 1 No: 0 Nombre: _____ No responde: x		
11	¿Para comprar los antibióticos tuvo que presentar la receta médica?	Si: 1 No: 2 No responde: x		

Anexo 6. Protocolo de microbiología para la identificación de *Escherichia coli* mediante cultivo y pruebas microbiológicas.

1. Procesamiento de las muestras de heces

1.1. Siembra de las muestras de heces en agar MacConkey.

1.2. Incubar a 37°C

1.3. Observar crecimiento a las 24 horas

2. Evaluación de colonias presuntivas de *Escherichia coli*

2.1. Evaluar la morfología macroscópica de las colonias con el fin de evidenciar colonias medianas, circulares y convexas con bordes definidos redondeados, fermentadoras de lactosa, con un color rosado.

2.2. Evaluar la morfología microscópica por tinción GRAM buscando bacilos GRAM negativos.

3. Verificación a través de las pruebas bioquímicas

3.1. Prueba de Indol

3.2. Prueba de H2S

3.3. Prueba de motilidad

3.4. Prueba de RM/VP

3.5 Prueba de TSI

5. Almacenamiento de la cepa

5.1. Almacenamiento de la cepa en TE y en BHI+glicerol al 10% a una temperatura de -70°C. >

Anexo 7. Control de la calidad de los medios de cultivo según los parámetros del CLSI 2017 y la norma ISO/TS11133-2.

AGAR MacCONKEY

Microorganismo	Características	Selectividad	Productividad	Resultado
Escherichia coli ATCC® 25922	Colonias rosadas y bacilos Gram negativos	No	Si	Conforme

	Agar MacConkey	Agar Mueller Hinton	Resultado
Color	Rojo	Ámbar	Conforme
Volumen	25 mL c/u	25 mL (4 mm) c/u	Conforme
Presentación	Mono Petri plástico	Mono Petri plástico	Conforme
ph	7.1	7.3	Conforme
Esterilidad	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Conforme

Anexo 8. Protocolo estandarizado de PCR convencional del laboratorio INSPI Quito - RAM.

Equipo: BioRad 1000

ETAPA I: Preparación de reactivos

1. Limpieza de la cabina con alcohol y ARNasas
2. Colocar el material necesario

N°	Material
1	Puntas de 0,2-10uL
2	Puntas de 2-20uL
3	Puntas de 20-200uL
4	Guantes 2 pares
5	Tubos de 500uL (ya rotulados)
6	Marcador Sharpie
7	Agua molecular

3. UV durante 20 min
4. Añadir 66uL de Agua molecular al tubo de tapa verde (primers, sondas)
5. Añadir 66uL de Agua molecular al tubo de tapa blanca (primers, sondas y DNA de IC)

6. Añadir 40uL de Agua molecular a cada estándar (ya están reconstituidos, están realizados alícuotas de 5uL)

7. Añadir 40uL de Agua molecular al tubo de tapa transparente, CONTROL + (mezclar pipeteando 10 veces de arriba abajo, concentración final: 10^5 por cada 5uL)

8. Almacenar los reactivos a -20°C

ETAPA II: Preparación de Máster Mix

1. Limpieza de la cabina con alcohol y ARNasas

2. Colocar el material necesario

N°	Material
1	Puntas de 0,2-10uL
2	Puntas de 2-20uL
3	Puntas de 20-200uL
4	Placa de PCR
5	Sellador FLU
6	Sellante (plástico)
7	Guantes 2 pares
8	Tubos de 500uL (2)
9	Marcador Sharpie

10	Agua molecular

3. UV durante 20 min
4. Determinar el tamaño muestral.
5. Preparación de la Taq Man: pipetear 60uL del vial 1B al 1A, identificar con el rótulo que viene en el kit y almacenar a -20°C.
6. Realizar cálculos para preparación de la Máster Mix según el volumen de muestras.
7. Mezclar despacio, spin y transferir 15uL para cada pocillo a utilizar.

ETAPA III: Dispensar ADN

1. Preparar los ADN para dispensar
2. Añadir 5uL de ADN de muestra, STD o controles
3. Dispensar en el gel de agarosa
4. Una vez dispensado el ADN, sellar la placa y asegurar.

Fuente: ECDC, 2012/ ROCHE

Anexo 9. Componentes de la reacción de PCR para *mcr* y CTX-M.

Componente	Volumen	Concentración final
GoTaq® Green Master Mix 2X	15 µl	0,96X
Agua molecular	3 µl	N. A
mcr 1 Primer forward	0.5 µl	0.4µM
*mcr 1*Primer reverse	0.5 µl	0.4 µM
mcr 2 Primer forward	0.5 µl	0.4µM
mcr 2 Primer reverse	0.5 µl	0.4 µM
mcr 3 Primer forward	0.5 µl	0.4µM
mcr 3 Primer reverse	0.5 µl	0.4 µM
mcr 4 Primer forward	0.5 µl	0.4µM
mcr 4 Primer reverse	0.5 µl	0.4µM
mcr 5 Primer forward	0.5 µl	0.4µM
mcr 5 Primer reverse	0.5 µl	0.4 µM
ADN bacteriano/control	2 µl	< 250 ng
Volumen final	25 µl	

Elaborado por: De La Torre, K. **Obtenido de:** (Rebelo et al., 2018).

Componente	Volumen	Concentración final
GoTaq® Green Master Mix 2X	12 µl	0,96X
Agua molecular	10 µl	N. A
Primer forward 10 µM	1 µl	0.4µM
Primer reverse 10 µM	1 µl	0.4 µM
ADN bacteriano/control	1 µl	< 250 ng
Volumen final	25 µl	

Elaborado por: De La Torre K.

Anexo 10. Condiciones para la amplificación del gen *mcr* y sus variantes y para el gen CTX-M.

Procedimiento	Temperatura	Tiempo	# Ciclos
Denaturación inicial	95°C	3 minutos	30
Denaturación	98°C	30 segundos	30
Hibridación	58°C	30 segundos	30
Extensión	72°C	1 minuto	30
Extensión final	72°C	5 minutos	30

Elaborado por: De La Torre K.

Procedimiento	Temperatura	Tiempo	# Ciclos
Denaturación inicial	95°C	3 minutos	30
Denaturación	95°C	30 segundos	30
Hibridación	52°C	30 segundos	30
Extensión	72°C	1 minuto	30
Extensión final	72°C	5 minutos	30

Elaborado por: De La Torre K.

Anexo 11. Manejo posterior de muestras y resultados del estudio.

Los desechos biológicos de este estudio fueron descartados por el departamento de desechos del INSPI-Quito, siguiendo las normas de bioseguridad del instituto detalladas en el Anexo 14. Los desechos del área de bacteriología fueron autoclavados y desechados en fundas rojas rotulados como desechos infecciosos. Los desechos tóxicos utilizados en biología molecular como el bromuro de etidio fueron desechados en envases herméticos de polipropileno con carbón activado y rotulado como sustancias químicas peligrosas; todos estos desechos fueron entregados a GADERE S.A que es la empresa encargada de la gestión ambiental de residuos.

El ADN obtenido en el estudio se almaceno en el cepario del INSPI Quito, y permanecerá por un periodo de 7 años hasta que se procederá a descartarlo siguiendo las normas de bioseguridad dadas por el INSPI – Quito.

La información obtenida en el estudio permanecerá guardada por un periodo de 7 años en la computadora propiedad de INSPI y manejada por el tutor, posterior a esto la información será destruida.

Anexo 12. Protocolo de purificación de amplicones.

1. Mezclar en partes iguales el reactivo membrane binding con los amplicones.
2. Dejar a temperatura ambiente por un minuto en reposo.
3. Armar la columna de purificación y añadir la mezcla anterior.
4. Dejar a temperatura ambiente por un minuto en reposo.
5. Añadir 700 µl del reactivo membrane wash.
6. Centrifugar a 14.000 rpm durante un minuto.
7. Desechar el sobrenadante del tubo colector.
8. Secar el tubo.
9. Añadir 500 µl del reactivo membrane wash.
10. Centrifugar durante cinco minutos a 14.000 rpm.
11. Desechar el sobrenadante del tubo colector.
12. Secar el tubo.
13. Centrifugar durante un minuto a 14.000 rpm.
14. Colocar la columna en un tubo Eppendorf® de 1.5 ml.
15. Añadir 50 µl de agua molecular nuclease free.
16. Dejar a temperatura ambiente por un minuto en reposo.
17. Centrifugar durante un minuto a 14.000 rpm.
18. Quitar columna, tapar y sellar con Parafilm el producto final decantado.
19. Identificar de acuerdo con lo solicitado.

Anexo 13. Control de calidad de la PCR.

Protocolo: MCR 1-5	**Responsable:** Kenny De La Torre S.	**Fecha de realización:** 09-01-2019

MÁSTER MIX MULTIPLEX

REACTIVOS	**CONCENTRACIÓN**	**C+**	**C-**
Agua molecular	-	3 µl	3 µl
Forward mcr 1 µM	0.4 µM	0.5 µl	0.5 µl
Reversemcr 1 µM	0.4 µM	0.5 µl	0.5 µl
Forward mcr 2 µM	0.4 µM	0.5 µl	0.5 µl
Reversemcr 2 µM	0.4 µM	0.5 µl	0.5 µl
Forward mcr 3 µM	0.4 µM	0.5 µl	0.5 µl
Reversemcr 3 µM	0.4 µM	0.5 µl	0.5 µl
Forward mcr 4 µM	0.4 µM	0.5 µl	0.5 µl
Reversemcr 4 µM	0.4 µM	0.5 µl	0.5 µl

Forward mcr 5 µM	0.4 µM	0.5 µl	0.5 µl
Reversemcr 5 µM	0.4 µM	0.5 µl	0.5 µl
TAQ 2X	0.96X	15 µl	15 µl
C+	-	2 µl	-
C-	-	-	2 µl
VOLUMEN FINAL	-	25 µl	25 µl

Protocolo: MCR 1-5 **Responsable:** Kenny De La Torre S. **Fecha de realización:** 09-01-2019

ELECTROFORESIS

CARACTERÍSTICAS	CONDICIONES
Agarosa	2%
Vol. amplicón	4 µl
Voltaje	85 V
Tiempo	45 min
Ladder	2 µl
Tinción	Et Br
Vol. TAE 1X	1 L

Anexo 14. Protocolo de eliminación de desechos biológicos.

- ✓ Los medios de cultivo listos para su eliminación serán transportados en contenedores, los mismos que serán auto clavados como medida de eliminación de microorganismos. En el caso de material de plástico, se emplearán bolsas autoclavables
- ✓ El material usado en la esterilización de material contaminado deberá ser resistente, para evitar riesgos de ruptura y derrame en la recolección y el transporte.
- ✓ Se deberá controlar la efectividad de la esterilización a través de indicadores físicos y químicos (cinta adhesiva)
- ✓ Al momento de iniciar la esterilización en autoclave se deberá alcanzar los 121°C, a partir del cual se tomará el tiempo de 1 hora.
- ✓ En caso del uso de objetos cortopunzantes como por ejemplo puntas de vidrio, inmediatamente después de utilizados se depositarán en recipientes de plástico duro o metal con tapa, con una abertura a manera de alcancía, que impida la introducción de las manos.
- ✓ Cabe indicar que el tratamiento de los desechos infecciosos y especiales se debe ejecutar en cada establecimiento de salud, en este caso el INSPI-CZ9, para lo que se tomará en cuenta el Reglamento para el Manejo de Desechos en Establecimientos de Salud, a fin a las disposiciones del Ministerio de Salud Pública.

Fuente: OMS/PAHO