



FACULTAD DE INGENIERIAS Y CIENCIAS APLICADAS

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR
DE LA RESISTENCIA A COLISTINA EN *Escherichia coli* Y *Klebsiella
pneumoniae* AISLADAS DE HECES DE HUMANOS Y DE ANIMALES
DE TRASPATIO EN COMUNIDADES RURALES DE LA COSTA Y
AMAZONÍA ECUATORIANA.

AUTORA

Mónica Salomé Guerrero Freire

AÑO

2020



FACULTAD DE INGENIERIAS Y CIENCIAS APLICADAS

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE LA RESISTENCIA A COLISTINA EN *Escherichia coli* Y *Klebsiella pneumoniae* AISLADAS DE HECES DE HUMANOS Y DE ANIMALES DE TRASPATIO EN COMUNIDADES RURALES DE LA COSTA Y AMAZONÍA ECUATORIANA.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor Guía

MSc. Carlos Andrés Bastidas Caldés

Autora

Mónica Salomé Guerrero Freire

Año

2020

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUIA

“Declaro haber dirigido el trabajo, Identificación y caracterización fenotípica y molecular de la resistencia a colistina en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* aisladas de heces de humanos y de animales de traspatio en comunidades rurales de la costa y amazonía ecuatoriana, a través de reuniones periódicas con la estudiante Mónica Salomé Guerrero Freire, en el semestre 202010, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”



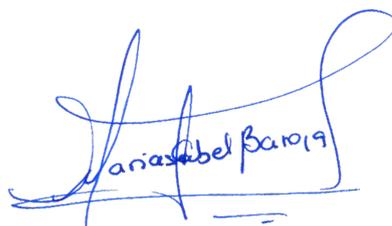
Carlos Andrés Bastidas Caldés

Máster en Microbiología Avanzada

CI: 0201619806

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Identificación y caracterización fenotípica y molecular de la resistencia a colistina en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* aisladas de heces de humanos y de animales de traspatio en comunidades rurales de la costa y amazonía ecuatoriana, de Mónica Salomé Guerrero Freire, en el semestre 202010, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”



María Isabel Baroja Oviedo

Máster en Biotecnología Biomédica

CI: 1720077211

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.



Mónica Salomé Guerrero Freire

CI: 1718687468

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo y eterno agradecimiento al MSc. Carlos Bastidas, quien me apoyó de forma invaluable y confió en mí para llevar a cabo este proyecto. Sin duda es alguien admirable, que con sus conocimientos y guía fue vital para mi formación profesional y para el descubrimiento de mi vocación.

Mi gratitud, admiración y cariño a la PhD^(c) Irina Villacrés, quién me ha transmitido sus conocimientos vastos en este camino. Su arduo trabajo e importante colaboración me enseñaron que lo más valioso es trabajar con pasión, entrega y constancia.

DEDICATORIA

A mis padres, Nelson y Mónica por haber hecho de mí la persona que soy hoy. Me han enseñado a trabajar duro, a buscar la grandeza y, sobre todo, a nunca rendirme. Son y serán siempre los pilares fundamentales en mi vida, todo se los debo a ellos. Los amo y los admiro.

A mi hermana, Andrea, a quién admiro, por estar a mi lado en todo momento y ser mi soporte en todas y cada una de las etapas de mi vida. A mi hermano, David, por siempre estar pendiente de mí y de mi desempeño. Es un gran ejemplo en mi vida.

RESUMEN

La colistina es considerada un antimicrobiano de último recurso para el tratamiento contra bacterias Gram negativas multirresistentes. Actualmente, su eficiencia se ve amenazada por su vasto uso en medicina veterinaria por más de 50 años, con enfoques terapéuticos, profilácticos, metafilácticos y como promotor de crecimiento. En 2016, se describió el primer gen de naturaleza plasmídica que confiere resistencia a colistina, *mcr-1*. En el mismo año, investigadores reportaron el primer y único aislamiento clínico en *Escherichia coli* portadora de este gen en Ecuador. En 2019, se realizó un estudio en animales de traspatio y se detectó la resistencia a colistina en el 47% de los individuos. Por esto, en esta investigación se identificó y caracterizó fenotípica y molecularmente la resistencia de *E. coli* y *K. pneumoniae* a colistina a partir de muestras fecales de humanos y de animales de traspatio en comunidades rurales de Santo Domingo y Pastaza en el Ecuador. Para esto, la toma de muestra se realizó mediante un hisopado rectal de los animales de traspatio y la obtención de muestras fecales humanas en frascos de recolección. Las muestras fueron sembradas en agar CHROMagar™ COL-APSE y cultivadas por 18 horas a 37°C. Se identificaron las bacterias de interés, se evaluó su resistencia fenotípica al antibiótico, se determinó si estas presentaban el gen *mcr-1* mediante PCR convencional y finalmente, se confirmaron los resultados con secuenciación tipo Sanger. De las 438 muestras fecales, se obtuvo un 86% de *E. coli* y un 37% de *K. pneumoniae*; de estas, el 90% de *E. coli* y el 20% de *K. pneumoniae* presentaron el gen de resistencia, *mcr-1*. Sin embargo, solo el 0.74% de los aislados fueron fenotípicamente resistentes a la colistina. Esto demuestra que el grado de coincidencia entre los dos métodos de detección es bajo. Por otra parte, al comparar estos datos con los publicados en el año 2019 en Ecuador, se observa, que existe un incremento importante de *E. coli* resistentes en las comunidades estudiadas y en esta investigación, se detectó por primera vez, *K. pneumoniae* portadoras del gen *mcr-1* en Ecuador, por lo que es indispensable tomar medidas de vigilancia para evitar la diseminación de la resistencia mediada por *mcr-1*.

ABSTRACT

Colistin is considered an antimicrobial of last resort for the treatment against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. Currently, its efficiency is threatened by its vast use in veterinary medicine for more than 50 years, with therapeutic, prophylactic, metaphylactic approaches and as a growth promoter. In 2016, the first gene of plasmid nature that confers colistin resistance, *mcr-1*, was described. In the same year, researchers reported the first and only clinical isolation in *Escherichia coli* carrying this gene in Ecuador. In 2019, a study was carried out in backyard animals and colistin resistance was detected in 47% of individuals. Therefore, this research identified and characterized phenotypically and molecularly the colistin resistance of *E. coli* and *K. pneumoniae* from fecal samples of humans and backyard animals in rural communities of Santo Domingo and Pastaza in Ecuador. For this, the sampling was done by rectal swab of the backyard animals and obtaining human fecal samples in collection bottles. Samples were seeded on CHROMagar™ COL-APSE agar and cultured for 18 hours at 37 ° C. The bacteria of interest were identified, their phenotypic resistance to the antibiotic was evaluated, it was determined whether they presented the *mcr-1* gene by conventional *PCR* and finally, the results were confirmed with Sanger sequencing. Of the 438 faecal samples, 86% of *E. coli* and 37% of *K. pneumoniae* were obtained; of these, 90% of *E. coli* and 20% of *K. pneumoniae* presented the resistance gene, *mcr-1*. However, only 0.74% of the isolates were phenotypically resistant to colistin. This shows that the degree of coincidence between the two detection methods is low. On the other hand, when comparing these data with those published in the year 2019 in Ecuador, it is observed that there is a significant increase of *E. coli* colistin resistant in the communities studied and in this investigation, *K. pneumoniae* carriers were detected for the first time of the *mcr-1* gene in Ecuador, so it is essential to take surveillance measures to avoid the spread of resistance mediated by *mcr-1*.

Índice

1. Capítulo I. Introducción	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Planteamiento del problema	5
1.3 Objetivos.....	7
1.3.1 Objetivo General.....	7
1.3.2 Objetivos específicos.....	7
1.4 Justificación de la investigación	7
2. Capítulo II. Marco teórico	8
2.1 Enterobacterias.....	8
2.1.1 Estructura	10
2.1.1.1 Pared celular	10
2.1.1.2 Estructura del LPS	12
2.1.2 <i>Escherichia coli</i>	14
2.1.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
2.2 Resistencia a antibióticos	16
2.2.1 Descubrimiento de los antibióticos	16
2.2.2 Papel de los antibióticos en la salud pública	18
2.2.3 Bases genéticas de resistencia antimicrobiana	19
2.2.3.1 Mutaciones cromosómicas.....	20
2.2.3.2 Incorporación de ADN foráneo a través de la transferencia horizontal de genes.....	20
2.2.4 Mecanismos generales de resistencia a antibióticos	22

2.2.4.1	Reducción de permeabilidad de la membrana	22
2.2.4.2	Inactivación del antibiótico	22
2.2.4.3	Alteración de la diana.....	23
2.2.4.4	Bombas de expulsión.....	23
2.3	Antibióticos de importancia crítica en medicina humana para el tratamiento de bacterias multirresistentes.....	23
2.4	Polimixinas.....	25
2.4.1	Colistina.....	26
2.4.1.1	Espectro de acción.....	27
2.4.1.2	Mecanismo de acción de la colistina frente a Enterobacterias.....	28
2.4.1.3	Uso de colistina en medicina humana.....	31
2.4.1.4	Uso de colistina en medicina veterinaria	32
2.5	Mecanismos bacterianos de resistencia a colistina	36
2.5.1	Mutaciones cromosómicas de resistencia a colistina	36
2.5.2	Transferencia horizontal de genes (gen <i>mcr</i>)	37
2.6	Acciones a mitigar o prevenir resistencia bacteriana.....	44
2.6.1	Enfoque Una Salud.....	44
3.	Capítulo III. Procedimientos	45
3.1	Población y muestra	45
3.2	Área de estudio.....	46
3.3	Toma de muestras	47
3.3.1	Recolección de muestras de humanos.....	47
3.3.2	Recolección de muestras de animales de traspatio (aves de corral y cerdos)	48

3.4	Identificación fenotípica de <i>Escherichia coli</i> y otras Enterobacterias.....	48
3.5	Identificación bioquímica de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	49
3.5.1	Fundamento de la técnica	50
3.6	Criopreservación de <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i> resistentes a colistina	53
3.7	Confirmación de resistencia a colistina mediante el método de microdilución con caldo	54
3.7.1	Fundamento de la técnica	54
3.7.2	Procedimiento.....	55
3.8	Extracción de ADN	56
3.9	Diseño y Selección de cebadores	56
3.10	Identificación molecular del gen <i>mcr</i> (<i>Mobile Colistin Resistance</i>).....	56
3.10.1	Diseño de PCR múltiple.....	56
3.10.2	Parámetros usados en la PCR múltiple	57
3.10.3	Visualización en geles de agarosa	58
3.11	Confirmación mediante secuenciación del gen <i>mcr</i>	58
3.12	Análisis estadístico.....	59
4.	Capítulo IV. Resultados y Discusión	60
4.1	Prevalencia de <i>E. coli</i> en la totalidad del estudio (humanos, cerdos y aves de corral)	60
4.1.1	Prevalencia de <i>E. coli</i> según hospedero.....	60
4.1.1.1	Prevalencia de <i>E. coli</i> en humanos	60
4.1.1.2	Prevalencia de <i>E. coli</i> en cerdos	61

4.1.1.3	Prevalencia de <i>E. coli</i> en aves de corral	62
4.1.2	Prevalencia de <i>E. coli</i> según comunidades	63
4.1.2.1	Prevalencia de <i>E. coli</i> en Santo Domingo de los Tsáchilas....	63
4.1.2.2	Prevalencia de <i>E. coli</i> en Pastaza.....	64
4.2	Prevalencia de <i>K. pneumoniae</i> en la totalidad del estudio (humanos, cerdos y aves de corral).....	65
4.2.1	Prevalencia de <i>K. pneumoniae</i> según hospedero	66
4.2.1.1	Prevalencia de <i>K. pneumoniae</i> en humanos.....	66
4.2.1.2	Prevalencia de <i>K. pneumoniae</i> en cerdos.....	67
4.2.1.3	Prevalencia de <i>K. pneumoniae</i> en aves de corral	67
4.2.2	Prevalencia de <i>K. pneumoniae</i> según comunidades	68
4.2.2.1	Prevalencia de <i>K. pneumoniae</i> en Santo Domingo de los Tsáchilas.....	68
4.2.2.2	Prevalencia de <i>K. pneumoniae</i> en Pastaza.....	69
4.3	Determinación de la concentración mínima inhibitoria por medio del método de microdilución en caldo	70
4.3.1	Resistencia fenotípica de <i>E. coli</i> a colistina	71
4.3.2	Resistencia fenotípica de <i>K. pneumoniae</i> a colistina.....	73
4.4	Diseño de cebadores para los genes <i>mcr-1</i> al <i>mcr-8</i>	74
4.5	Determinación genotípica de la resistencia a colistina de genes <i>mcr-1</i> y <i>mcr-4</i> mediante PCR múltiple	75
4.5.1	PCR múltiple para genes <i>mcr-1</i> y <i>mcr-4</i> en <i>E. coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>	75
4.6	Prevalencia del gen <i>mcr-1</i> en <i>E. coli</i> en la totalidad del estudio (humanos, cerdos y aves de corral)	77
4.6.1	Prevalencia de <i>E. coli</i> portadoras de <i>mcr-1</i> según hospedero	77

4.6.1.1	Prevalencia de <i>E. coli</i> portadoras de <i>mcr-1</i> en humanos.....	77
4.6.1.2	Prevalencia de <i>E. coli</i> portadoras de <i>mcr-1</i> en cerdos.....	78
4.6.1.3	Prevalencia de <i>E. coli</i> portadoras de <i>mcr-1</i> en aves de corral.....	78
4.6.2	Prevalencia de <i>E. coli</i> portadoras de <i>mcr-1</i> según comunidades.....	79
4.6.2.1	Prevalencia en la comunidad La Reforma (Santo Domingo de los Tsáchilas).....	79
4.6.2.2	Prevalencia en las comunidades San José y Samasunchi (Pastaza).....	80
4.7	Prevalencia del gen <i>mcr-1</i> en <i>K. pneumoniae</i> en la totalidad del estudio (humanos, cerdos y aves de corral).....	81
4.7.1	Prevalencia de <i>K. pneumoniae</i> portadoras de <i>mcr-1</i> según hospedero.....	81
4.7.1.1	Prevalencia de <i>K. pneumoniae</i> portadoras de <i>mcr-1</i> en humanos.....	82
4.7.1.2	Prevalencia de <i>K. pneumoniae</i> portadoras de <i>mcr-1</i> en cerdos.....	82
4.7.1.3	Prevalencia de <i>K. pneumoniae</i> portadoras de <i>mcr-1</i> en aves de corral.....	83
4.7.2	Prevalencia de <i>K. pneumoniae</i> portadoras de <i>mcr-1</i> según comunidades	85
4.7.2.1	Prevalencia en la comunidad La Reforma (Santo Domingo de los Tsáchilas).....	85
4.7.2.2	Prevalencia en las comunidades San José y Samasunchi (Pastaza).....	86
4.8	Confirmación de genes <i>mcr</i> por secuenciación	86
4.9	Análisis estadístico.....	88

4.10 Comparación de métodos fenotípicos y moleculares para la detección de resistencia a colistina	91
4.10.1 <i>E. coli</i> portadoras del gen <i>mcr-1</i> que presentaron resistencia fenotípica	91
4.10.2 <i>K. pneumoniae</i> portadoras del gen <i>mcr-1</i> que presentaron resistencia fenotípica	92
4.10.3 Dificultades en el método de microdilución en caldo para la determinación de resistencia a colistina	93
4.11 Implicaciones del uso de antibióticos en la resistencia bacteriana. El caso de colistina:	95
5. Conclusiones y recomendaciones	100
5.1 Conclusiones	100
5.2 Recomendaciones	101
Referencias	103
ANEXOS	123

Índice de Tablas

Tabla 1. Interpretación de la batería de pruebas bioquímicas para la confirmación de <i>K. pneumoniae</i>	53
Tabla 2. Condiciones de los ciclos de PCR múltiple para la amplificación de los genes <i>mcr-1</i> y <i>mcr-4</i>	58
Tabla 3. <i>E. coli</i> resistentes a colistina en base al método de microdilución en caldo según puntos de corte del CLSI.....	71
Tabla 4. <i>K. pneumoniae</i> resistentes a colistina en base al método de microdilución en caldo.....	73
Tabla 5. Cebadores diseñados en el programa bioinformático PRIMER-BLAST para los genes <i>mcr</i> (<i>mcr-1</i> al <i>mcr-8</i>).....	74
Tabla 6. Análisis de secuencias <i>mcr-1</i> de <i>E. coli</i> de humanos en base a BLASTn.....	87
Tabla 7. Resumen de los resultados obtenidos de los aislados del estudio, según los hospederos.....	89
Tabla 8. Resumen de los resultados obtenidos de la prevalencia de <i>mcr-1</i> , según los hospederos.....	89
Tabla 9. Prevalencias de <i>E. coli</i> portadoras de <i>mcr-1</i> en las dos regiones del estudio, según hospederos.....	91
Tabla 10. Resumen de resultados según hospedero y bacteria.....	12
Tabla 11. Resumen de resultados según la población total.....	13
Tabla 12. Resumen de resultados según la zona de estudio.....	13
Tabla 13. Resumen de resultados según la zona y los hospederos del estudio (<i>E. coli</i>).....	14
Tabla 14. Resumen de resultados según la zona y los hospederos del estudio (<i>K. pneumoniae</i>).....	15

Índice de Figuras

Figura 1. Localización de las infecciones más frecuentes manifestadas en humanos causadas por Enterobacterias	10
Figura 2. Estructura de la pared celular de las bacterias Gram negativas.	12
Figura 3. Estructura del polisacárido presente únicamente en bacterias Gram negativas.	14
Figura 4. Acontecimientos importantes, cronología del descubrimiento de nuevos antibióticos y desarrollo de resistencia bacteriana.	17
Figura 5. Mecanismos naturales de adquisición de material genético de importancia.	21
Figura 6. Estructura básica de las polimixinas.	27
Figura 7. Mecanismo de acción de la colistina en la membrana externa de bacterias Gram negativas.	30
Figura 8. Especies animales productoras de alimentos provenientes de notificaciones de 18 países de la región de las Américas.	34
Figura 9. Antibióticos utilizados como promotores de crecimiento en 15 países pertenecientes a la OIE	35
Figura 10. Activación de genes modificadores de LPS, implicados en la resistencia a la colistina en bacterias Gram negativas.	37
Figura 11. Distribución del gen <i>mcr</i> en los continentes africano y europeo en animales productores de alimentos	39
Figura 12. Distribución del gen <i>mcr</i> en los continentes africano y europeo en humanos.	40
Figura 13. Visión global de los genes <i>mcr</i> junto con los diferentes tipos de huéspedes, bacterias y plásmidos.	41
Figura 14. Frecuencia y distribución de genes <i>mcr</i> según hospederos y variantes del gen.	42
Figura 15. Distribución del gen <i>mcr</i> en América Latina y el Caribe, según la especie y el origen de los aislamientos.	43
Figura 16. Área de estudio.	47

Figura 17. Frecuencia de <i>E. coli</i> en los hospederos (humanos, cerdos y aves de corral) de la población.	63
Figura 18. Prevalencia y distribución de <i>E. coli</i> con respecto a los hospederos del estudio, en comunidades de Santo Domingo.	64
Figura 19. Frecuencia y distribución de <i>E. coli</i> con respecto a los hospederos del estudio, en comunidades de Pastaza.	65
Figura 20. Distribución de <i>K. pneumoniae</i> en los hospederos (humanos, cerdos y aves de corral) de la población.	68
Figura 21. Frecuencia y distribución de <i>K. pneumoniae</i> con respecto a los hospederos del estudio, en comunidades de Santo Domingo.	69
Figura 22. Frecuencia y distribución de <i>K. pneumoniae</i> con respecto a los hospederos del estudio, en comunidades de Santo Domingo.	70
Figura 23. Productos de la PCR múltiple a partir de muestras de ADN de <i>E. coli</i>	76
Figura 24. Productos de la PCR múltiple a partir de muestras de ADN de <i>K. pneumoniae</i>	76
Figura 25. Frecuencia del gen <i>mcr-1</i> en hospederos (humanos, cerdos y aves de corral) portadores de <i>E. coli</i>	79
Figura 26. Frecuencia y distribución de <i>E. coli</i> portadoras del gen <i>mcr-1</i> con respecto a los hospederos del estudio, en Santo Domingo.	80
Figura 27. Frecuencia y distribución de <i>E. coli</i> portadoras del gen <i>mcr-1</i> con respecto a los hospederos del estudio, en comunidades de Pastaza.	81
Figura 28. Distribución del gen <i>mcr-1</i> en hospederos (humanos, cerdos y aves de corral) portadores de <i>K. pneumoniae</i>	84
Figura 29. Frecuencia y distribución de <i>K. pneumoniae</i> portadoras del gen <i>mcr-1</i> con respecto a los hospederos del estudio, en Santo Domingo.	85
Figura 30. Frecuencia y distribución de <i>K. pneumoniae</i> portadoras del gen <i>mcr-1</i> con respecto a los hospederos del estudio, en comunidades de Pastaza.	86
Figura 31. Número de países que utilizan agentes antimicrobianos para la promoción de crecimiento en animales.	97

1. Capítulo I. Introducción

1.1 Antecedentes

La farmacorresistencia, en la actualidad, es una de las amenazas globales más graves para la salud humana (CDC, 2013). La colistina o polimixina E, es un antibiótico considerado como opción terapéutica de última línea contra las infecciones bacterianas Gram negativas multirresistentes (J. Zhang et al., 2018). Años después de su descubrimiento, el efecto de la colistina se ve amenazado por el uso excesivo en medicina y alimentación veterinaria.

La colistina es un antibiótico perteneciente al grupo de las polimixinas, polipéptidos catiónicos que se unen a los lipopolisacáridos bacterianos (LPS) (Liu et al., 2016) e inducen a la fuga de componentes intracelulares al romper la membrana celular (Eiamphungporn et al., 2018). Existen cinco tipos diferentes de polimixinas (A-E), de las cuales se destacan la polimixina B y E (colistina) (Landman et al., 2008). Estas poseen un reducido margen terapéutico para combatir infecciones producidas por bacterias Gram negativas, ya que no se incluyen todos los géneros de la familia Enterobacteriaceae como *Stenotrophomonas maltophilia*, *Proteus* sp., *Providencia* sp., *Serratia* sp. y *Burkholderia* sp., puesto que son patógenos naturalmente resistentes a la colistina (Falagas, Rafailidis, & Matthaiou, 2010).

Históricamente, las polimixinas se obtuvieron de diversas especies de *Paenibacillus polymyxa*, bacterias del suelo (Benedict & Langlykke, 1947). En 1950, la colistina y la polimixina B se usaron comercialmente, ya que difieren solo en un aminoácido entre sí y poseen una actividad biológica comparable (Liu et al., 2016). A inicios de 1970 se registraron reacciones adversas como la

nefrotoxicidad y neurotoxicidad al administrarse sistémicamente, y se restringió su uso en la medicina humana (European Medicines Agency, 2013; Kempf et al., 2013; Landman et al., 2008). Al contrario, el empleo de la colistina en medicina veterinaria incrementó de manera importante (Dalmolin et al., 2018; Kempf et al., 2013) como un medicamento veterinario enfocado en el tratamiento de infecciones del tracto gastrointestinal en aves de corral y cerdos (Dalmolin et al., 2018). Su uso se incluye en diarrea post-destete y edema (Mourand et al., 2018). Además, se introdujo como un profiláctico para evitar enfermedades infecciosas que provocan efectos adversos e incluso la muerte, especialmente en lechones, lo que produce pérdidas económicas grandes. Sin embargo, la ausencia de producción de nuevos fármacos durante los últimos 30 años motivó la reintroducción de la colistina como un antibiótico de último recurso, para tratar infecciones ocasionadas por bacterias Gram negativas multirresistentes (Aguayo et al., 2016; Sun et al., 2018).

Inicialmente, el mecanismo de resistencia a la colistina estaba solamente asociado con los sistemas de regulación de dos productos proteicos PmrAB y PhoPQ, implicados en la modificación de lipopolisacáridos (LPS). Al alterarse estos sistemas reguladores (mutaciones cromosómicas) se modifica la capa LPS, lo que disminuye la carga negativa de la membrana bacteriana externa reduciendo la afinidad de la colistina (Eiamphungporn et al., 2018; Poirel, Jayol, & Nordmann, 2017), hasta que en 2016, Liu et al identificaron, por primera vez, un gen de resistencia a la colistina contenido en un plásmido. El elemento móvil contiene el gen *mcr-1*, que codifica la expresión de la fosfoetanolamina transferasa que transfiere la fosfoetanolamina al lípido A, lo que confiere resistencia al antibiótico en la familia Enterobacteriaceae (Eiamphungporn et al., 2018).

La identificación del gen *mcr-1* se realizó en un estudio retrospectivo de prevalencia en aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae*, donde se determinó la presencia de *E. coli* portadoras del gen en muestras de carne cruda, animales y

pacientes hospitalizados con infección (Liu et al., 2016). Este descubrimiento desafió todo conocimiento existente sobre la resistencia a la colistina en bacterias Gram negativas. Por esto, la vigilancia a nivel mundial incrementó y se reportaron Enterobacterias colistina-resistentes, entre las que se destacan *E. coli* y *K. pneumoniae* portadoras del gen *mcr-1* en América (Colombia, Perú, Bolivia, Argentina y Brasil) y Europa, lo que sugiere una posible transferencia horizontal de genes resistentes a colistina (Moura et al., 2016; Quiroga et al., 2018).

Tras el descubrimiento del gen *mcr-1* en China, se han identificado nueve variantes del gen *mcr* a nivel mundial, así por ejemplo: *mcr-1* en Asia, América y Europa (Belaynehe et al., 2018; Eiamphungporn et al., 2018; Y.-Y. Liu et al., 2016; Mourand et al., 2018; Ortega-Paredes, Barba, & Zurita, 2016; Sun, Li, et al., 2018), *mcr-2* en Bélgica (Xavier et al., 2016), *mcr-3* en China (Yin et al., 2017), *mcr-4* en España (Carattoli et al., 2017), *mcr-5* en Alemania y Brasil (Borowiak et al., 2017; Quiroga et al., 2018), *mcr-6* y *mcr-7* que se anotaron y se depositaron en GenBank, *mcr-8* en China (Xiaoming Wang et al., 2018) y *mcr-9* en Estados Unidos (Carroll et al., 2019).

De acuerdo a los reportes del apareamiento de los genes de resistencia, los estudios nombrados por la OPS y OMS (2016) demuestran la presencia de *mcr-1* en varios países de América. Es así que, la Agencia de Salud Pública de Canadá informó sobre el descubrimiento del gen *mcr-1* en tres muestras de *E. coli*, colectadas para proyectos de investigación (Zhi et al., 2016). También, se detectó el gen *mcr-1* en 6 de 9 aislamientos de *E. coli* productores de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) que presentaron resistencia a colistina en muestras de turistas holandeses que visitaron Latinoamérica (Zhi et al., 2016). Por otro lado, en Brasil se informó la detección de los genes *mcr-1* y *mcr-5* en *E. coli* aislado a partir de muestras provenientes de alimentos y animales (M. Fernandes et al., 2016). En el Ecuador, se reportó el primer aislamiento clínico de *E. coli* portadoras del gen *mcr-1* obtenido a partir del líquido peritoneal de un joven de 14 años con apendicitis aguda (Ortega-Paredes et al., 2016). En mayo

del mismo año, Colombia informó sobre la detección del gen *mcr-1* en aislados de *E. coli* y *Salmonella enterica* (OPS & OMS, 2016). Finalmente, en Argentina se expusieron nuevos casos de cepas clínicas de *E. coli* portadoras del gen *mcr-1* detectadas en infecciones invasivas lo que demuestra su adaptación al ambiente hospitalario (Rapoport et al., 2016).

Por otra parte, en Colombia, se detectó el primer aislado de *E. coli* que contenía el gen *mcr-5*, descubierto en un paciente con infección del tracto urinario (Wise et al., 2018). Asimismo, en Brasil se reportó la variante *mcr-5.3* en un aislado de *E. coli* colistina-resistente a partir del tejido pulmonar de un caballo enfermo que murió por neumonía (M. R. Fernandes et al., 2018). Y finalmente, en el mismo año se detectó la variante del gen *mcr-3* (*mcr-3.12*) en un estudio que analizó muestras fecales de cerdos (Kieffer et al., 2018).

En 2019, se detectó, en Uruguay, el gen *mcr-5* en bacterias aisladas a partir de muestras de hisopados cloacales tomadas en granjas avícolas del país, por Nesporova y colaboradores. Por su parte, en Ecuador, un estudio realizado por Yamamoto y colaboradores en 2019 (2019) informa la resistencia a colistina en el 47% de los individuos de su estudio (34 cerdos y 32 aves de corral), y la propagación acelerada de la resistencia al mismo antibiótico mediada por plásmidos, en comunidades rurales tropicales de Ecuador.

El incremento de la resistencia en animales y humanos, así como el uso de colistina como promotor de crecimiento, genera una preocupación en el sistema de salud pública y las cadenas de industria alimenticia. En Ecuador, hasta el presente año se conocía la venta libre de alimentos balanceados para animales con colistina como aditivo, tanto en la costa como en la amazonía (AGROCALIDAD, 2019).

Hasta el momento no se han obtenido reportes de brotes o muertes causadas por portadores de este gen, pero si existe la posibilidad de su diseminación en la población a través de plásmidos a cepas más virulentas o clones hiperepidémicos (Organización Panamericana de la Salud & Organización Mundial de la Salud, 2016).

1.2 Planteamiento del problema

En 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) enlistó los antimicrobianos de importancia para la medicina humana, y los clasificó en tres categorías de interés (importancia crítica, altamente importante e importante) (World Health Organization, 2017a). La colistina se clasificó como antibiótico de importancia crítica y prioridad máxima, ya que se considera un medicamento de último recurso en el tratamiento de infecciones graves en humanos (AGROCALIDAD, 2019).

No obstante, el uso de colistina como promotor de crecimiento, no tuvo interrupciones, lo que provocó la resistencia al antibiótico en Enterobacterias (Kempf et al., 2013; Poirel et al., 2017); incluso se ha reportado la sobredosificación de colistina oral (dilución en agua y alimentos) en lechones sin tomar en cuenta el peso del animal, como lo informaron Timmerman y colaboradores (2006). De hecho, Belaynehe et al informaron que, entre los años 2005 y 2015, en promedio, se aplicaron entre 6 y 16 toneladas de colistina en animales productores de alimentos (2018). Esto demuestra que el consumo de colistina, en promedio, fue 600 veces más alto en animales, que en humanos (Skov & Monnet, 2016). Por lo tanto, las raciones iniciales de colistina como profiláctico y promotor de crecimiento se suman al problema (Poirel et al., 2017).

Los datos epidemiológicos y las pruebas de susceptibilidad al antibiótico realizadas en *E. coli* provenientes de aves de corral y cerdos aseguraron que existe una prevalencia elevada de la resistencia a la colistina en animales destinados a consumo alimenticio (EUR-Lex, 2013).

Alba y colaboradores en 2018 expusieron que esta alta propagación de resistencia aumenta la probabilidad de transferencia de plásmidos contenedores del gen *mcr* a otros patógenos zoonóticos importantes, lo que llevó a suponer que estos genes se pueden transmitir de los animales a los humanos a través de la cadena alimenticia (Jakobsen et al., 2010; Poirel et al., 2017).

Ante esta situación, la OPS y la OMS (2016) exhortan a los estados miembros a implementar y mantener la capacidad para detectar, prevenir y controlar la transmisión de microorganismos con resistencia transferible a colistina. También demandan medidas que conduzcan la prohibición del uso de estos antimicrobianos para profilaxis y/o como promotores de crecimiento en animales destinados al consumo humano.

Aunque actualmente, está confirmada la presencia del gen *mcr-1* en Ecuador y su diseminación acelerada, se desconoce la dinámica de transmisión y la prevalencia en animales y humanos residiendo en las mismas comunidades tropicales y rurales; por lo cual, es necesario conocer la situación actual en varios hospederos humanos y animales sanos, y tener una línea base para documentar el posible incremento y esparcimiento de esta resistencia que como se ha visto, alerta a los sistemas de salud pública y alimentaria.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Identificar y caracterizar fenotípica y molecularmente la resistencia a colistina a partir de las enterobacterias *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* aisladas de muestras fecales de humanos y de animales de traspatio (aves de corral y cerdos) en comunidades rurales de la costa y amazonía ecuatoriana.

1.3.2 Objetivos específicos

- Aislar e identificar *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* resistentes a colistina a partir de muestras fecales de humanos y de animales de traspatio (aves de corral y cerdos).
- Diseñar cebadores para la amplificación del gen *mcr* y sus ocho variantes.
- Determinar la presencia del gen *mcr* y caracterizar sus variantes en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

1.4 Justificación de la investigación

Dada la necesidad por conservar la colistina como opción terapéutica de última línea en humanos, es necesaria una regulación para el uso de colistina en medicina clínica y veterinaria, puesto que representa un riesgo para la salud pública por su relación con la transferencia del gen *mcr* por medio de la cadena alimenticia (Liu et al., 2016).

La resistencia a colistina mediada por el gen *mcr* está evolucionando de una manera acelerada (Alba et al., 2018). Se necesita información oportuna sobre la epidemiología molecular y la prevalencia de los aislados de bacterias *mcr* positivas, para prevención y control de la propagación de esta resistencia (Poirel et al., 2017).

La detección temprana de los casos de resistencia al antimicrobiano y la implementación de medidas de control adecuadas son necesarias para que Latinoamérica y el mundo no enfrenten brotes hospitalarios y comunitarios de infecciones, caso contrario habrá pocas o posiblemente ninguna opción de tratamiento con antibióticos (Skov & Monnet, 2016).

El presente estudio es un proyecto piloto que pretende establecer una línea base sobre la resistencia a este antibiótico en zonas rurales tropicales y la transmisión de genes bacterianos de resistencia en la relación humano-animal, con la intención de informar a la comunidad médico-científica sobre el estado de la resistencia a la colistina para aportar con información en la toma de decisiones futuras sobre el uso de antibióticos en humanos y animales.

2. Capítulo II. Marco teórico

2.1 Enterobacterias

Las Enterobacterias o bacterias entéricas comprenden la familia más grande y heterogénea de bacilos Gram negativos, aerobios facultativos que no esporulan son inmóviles o móviles por flagelos peritricos (Madigan et al., 2015), de importancia clínica. Según Murray et al (2014), hasta la fecha se han descrito 50

géneros y se han clasificado en función de propiedades bioquímicas, estructura antigénica y secuenciación del ARNr 16S.

Estas bacterias pueden encontrarse en suelo, agua, vegetación y más importante aún forman parte del tubo digestivo humano y animal. Debido a su colonización y diversidad, son las causantes de una gran variedad de infecciones en el ser humano, que incluyen un tercio de todas las bacteriemias, más del 70% de infecciones del tracto urinario (ITU), muchas enfermedades intestinales y sepsis. A pesar de la variedad de géneros de enterobacterias, las infecciones humanas normalmente, son causadas por un grupo limitado de especies (*Ver figura 1*).

Microorganismos como *Salmonella* serotipo Typhi, *Shigella*, *Yersinia pestis*, entre otras se asocian siempre a enfermedades en el ser humano por lo que se consideran patógenos obligatorios (Murray et al., 2014). Por otro lado, los patógenos oportunistas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y otras enterobacterias forman parte de la microbiota comensal; lo que quiere decir que en ocasiones crecen incontroladamente produciendo enfermedad en el hospedador (Madigan et al., 2015; Murray et al., 2014).

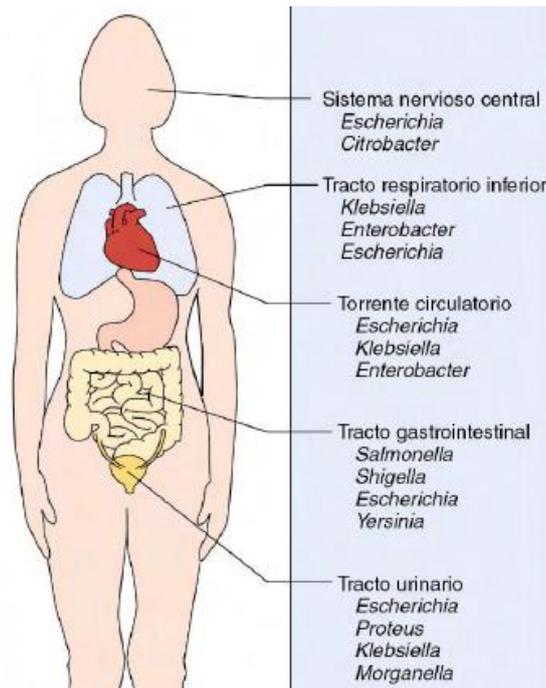


Figura 1. Localización de las infecciones más frecuentes manifestadas en humanos causadas por Enterobacterias, ordenadas por orden de prevalencia. Tomado de: (Murray et al., 2014)

2.1.1 Estructura

Las bacterias se pueden dividir en dos grandes grupos, Gram positivas y Gram negativas (Madigan et al., 2015). Primeramente, las bacterias Gram negativas poseen una membrana externa (LPS, endotoxina), su pared celular es delgada y está conformada por una capa fina de peptidoglicano, mientras que las bacterias Gram positivas tienen una pared celular en la que el peptidoglicano es de mayor grosor (Murray et al., 2014).

2.1.1.1 Pared celular

La pared celular de las bacterias Gram negativas contiene dos capas situadas en el exterior de la membrana citoplasmática. Inmediatamente, por fuera de esta

membrana se sitúa una capa delgada de peptidoglicano (Murray et al., 2014), polisacárido compuesto por dos derivados de azúcares (*N-acetilglucosamina* y el *ácido N-acetilmurámico*,) que es responsable de proveer resistencia celular y mantener la presión osmótica (Madigan et al., 2015).

Después del peptidoglicano se sitúa la membrana externa denominada también lipopolisacárido (LPS), y constituye el principal antígeno de las bacterias Gram negativas (*Ver figura 2*) (Madigan et al., 2015; Pérez Guerrero et al., 2014).

El espacio comprendido entre la superficie exterior de la membrana citoplasmática y la superficie interior membrana externa (*ver Figura 2*) es conocido como periplasma o espacio periplásmico (Murray et al., 2014) y tiene una consistencia gelatinosa debido a la alta concentración de proteínas que posee (Madigan et al., 2015). En este espacio se alojan diferentes enzimas hidrolíticas (proteasas, fosfatasas, lipasas, nucleasas y enzimas metabolizadoras de carbohidratos) responsables de la metabolización y degradación de macromoléculas.

En el caso de bacterias patógenas en esta zona también se alojan factores de virulencia líticos, entre los que se destacan colagenasas, hialuronidasas, proteasas y β -lactamasas (Murray et al., 2014).

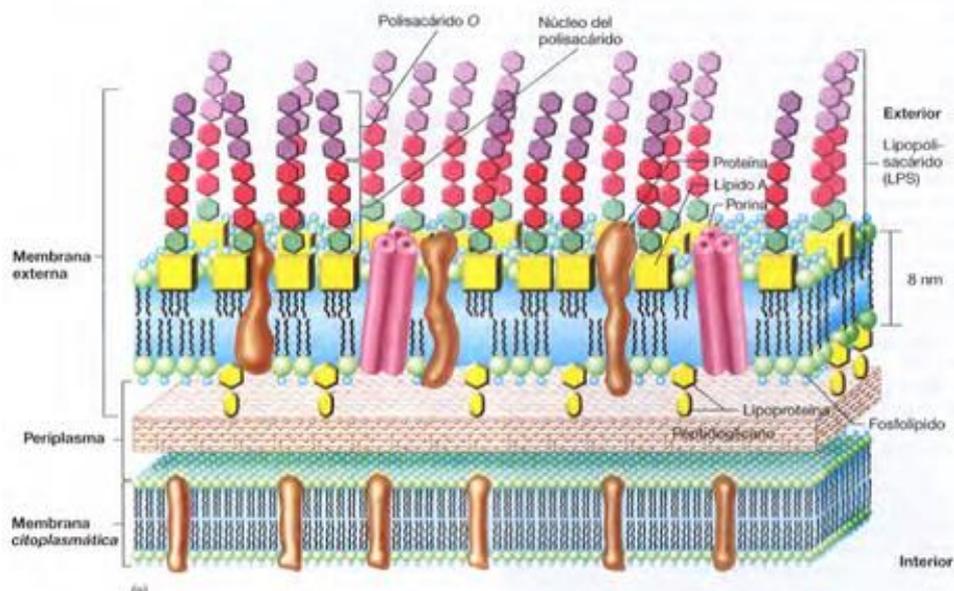


Figura 2. Estructura de la pared celular de las bacterias Gram negativas. Disposición de la membrana citoplasmática, periplasma y membrana externa, estructuras principales.

Tomado de: (Madigan et al., 2009)

2.1.1.2 Estructura del LPS

El LPS es el principal antígeno (factor de virulencia) de la pared celular formado por dos componentes polisacáridos: polisacárido O específico y núcleo polisacárido (antígeno común compartido por Enterobacterias) y un componente lipídico: lípido A (ver *Figura 3*) (Madigan et al., 2015; Murray et al., 2014).

2.1.1.2.1 Polisacárido O específico

El polisacárido O específico o antígeno somático tiene gran importancia desde el punto de vista de la tipificación inmunológica de una bacteria (Mandrell & Apicella, 1993), es decir sirve para la clasificación epidemiológica de una cepa bacteriana dentro de una especie (Murray et al., 2014). Este polisacárido está formado por azúcares (galactosa, glucosa, ramnosa y manosa) así como

didesoxihexosas como abecuosas, colitosa, paratosa y tivelosa, aunque no son esenciales para la supervivencia de una bacteria (Mandrell & Apicella, 1993).

2.1.1.2.2 Núcleo del polisacárido

El núcleo polisacárido “core” está formado por cetodesoxioctonato (KDO por sus siglas en inglés), heptosas, glucosa, galactosa y N-acetilglucosamina (Madigan, M. Martinko, J. Bender, K. Buckley, D. Stahl, 2015a); y se representa como el punto de unión del polisacárido O específico y el lípido A. Este elemento del LPS tiene importancia para la clasificación de microorganismos como miembros de la familia Enterobacteria (Murray et al., 2014).

2.1.1.2.3 Lípido A

El lípido A está unido al núcleo polisacárido por medio del KDO (Madigan, M. Martinko, J. Bender, K. Buckley, D. Stahl, 2015a). Es un componente tóxico (endotoxina) presente en Enterobacterias aerobias y algunas anaerobias (Murray et al., 2014). Provoca efectos adversos en algunas células animales y su principal función es provocar sepsis (Kruglov et al., 2011). También provoca síntomas como vómitos, diarrea y flatulencias en humanos. Ejemplos típicos son las endotoxinas producidas por cepas de *Salmonella* y *E. coli*, transmitidas a través de alimentos contaminados (Madigan et al., 2015).

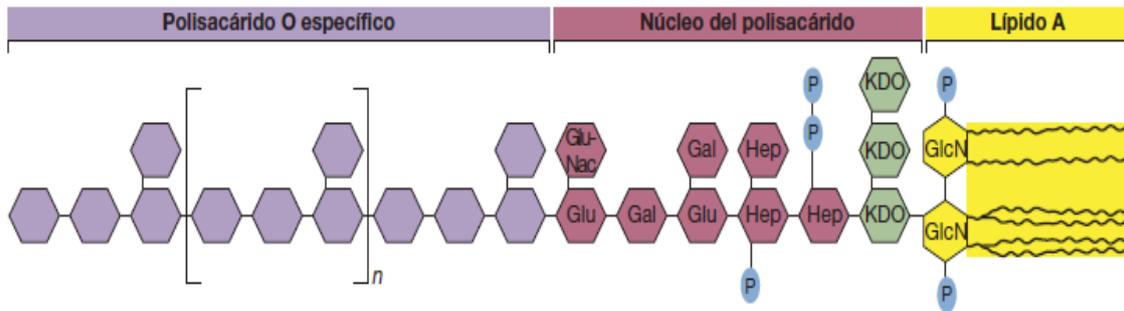


Figura 3. Estructura del polisacárido presente únicamente en bacterias Gram negativas. Se puede apreciar el polisacárido o específico, la estructura más externa del LPS, seguida del núcleo polisacárido y el lípido A (endotoxina).

Tomado de: (Madigan et al., 2015)

2.1.2 *Escherichia coli*

Miembro más usual y relevante del género *Escherichia*. Este microorganismo se relaciona a varias enfermedades entre las que se destaca la gastroenteritis (adquisición exógena), infecciones de tracto urinario (ITU), bacteriemia, meningitis neonatal y sepsis. Aunque esta bacteria forma parte de la flora normal intestinal es un patógeno oportunista que posee múltiples factores de virulencia que causan infección cuando las defensas del hospedador se alteran (Murray et al., 2014). Las cepas de *E. coli* productoras de gastroenteritis se clasifican en los siguientes grupos:

- *E. coli* enteropatógena (ECEP)
- *E. coli* enterotoxigénica (ECET)
- *E. coli* enteroagregativa (ECEA)
- *E. coli* enterohemorrágica (ECEH)
- *E. coli* enteroinvasiva (ECEI)

Los tres primeros grupos causan diarreas secretoras, ya que afectan al intestino delgado, y los dos siguientes grupos afectan al intestino grueso, los países en vías de desarrollo son los más afectados por esta patología (Pérez Guerrero et al., 2014).

Además de causar las enfermedades antes mencionada esta bacteria también puede presentar resistencia a antibióticos. Es así que Liu y colaboradores (2016) identificaron por primera vez *E. coli* portadoras del gen de resistencia a colistina, *mcr-1* proveniente de plásmidos. Este gen se ha reportado en todo el mundo, principalmente en animales productores de alimento, humanos y el medio ambiente (Poirel et al., 2017).

2.1.3 *Klebsiella pneumoniae*

Esta bacteria posee una cápsula de polisacáridos que morfológicamente le da una apariencia mucóide y mayor virulencia frente a otros microorganismos *in vivo* (Murray et al., 2014; Padilla Chumacero, 2013). El hábitat principal del género *Klebsiella* es el tracto gastrointestinal de algunos animales y el humano (Pérez Guerrero et al., 2014). Este microorganismo es una causa habitual de infecciones nosocomiales y comunitarias como la neumonía lobular primaria, que conllevan a la necrosis de los espacios alveolares de los pulmones (Pérez Guerrero et al., 2014). Otros síndromes clínicos provocados por estas bacterias son las ITU, infección abdominal, infección de heridas quirúrgicas, infección de partes blandas y bacteriemia (Murray et al., 2014).

Así como *E. coli*, *K. pneumoniae* ha adquirido resistencia a antibióticos. Por ejemplo, los principales mecanismos de resistencia colistina en esta bacteria se deben a mutaciones intrínsecas que involucran polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en los genes del sistema de regulación de dos componentes

phoPQ o *pmrAB* (Olaitan, Morand, & Rolain, 2014). Sin embargo, Wang y colaboradores (2018) detectaron la variante *mcr-8* en este microorganismo, lo que demuestra la fácil trasmisión de genes a través de mecanismos de resistencia adquirida.

2.2 Resistencia a antibióticos

2.2.1 Descubrimiento de los antibióticos

La *figura 4* muestra la historia del descubrimiento de antibióticos y el desarrollo concomitante de resistencia a los mismos. En “la edad oscura” no existían antibióticos para el tratamiento de enfermedades. En 1940, “la era primordial” se destacó por el descubrimiento de las sulfamidas que fueron usadas en quimioterapia y en otras líneas terapéuticas.

En 1950, surge “la era dorada”, en la cual la mayoría de los antibióticos conocidos hoy en día fueron descubiertos; pero a mediados de esta época se reportan los primeros casos de resistencia a antimicrobianos en Japón, lo que encendió una alarma debido a que se reportó que estos genes de resistencia eran transferidos por conjugación bacteriana (Davies, 1995).

En 1960, se hicieron intentos por comprender y optimizar el uso de antibióticos en cuanto a dosificación y administración, y paralelamente surgió resistencia transmitida mediante plásmidos hacia antibióticos como las fluoroquinolonas. A partir de este año, la resistencia a antimicrobianos incrementó de forma significativa y lo sigue haciendo hasta la fecha (Davies & Davies, 2010).

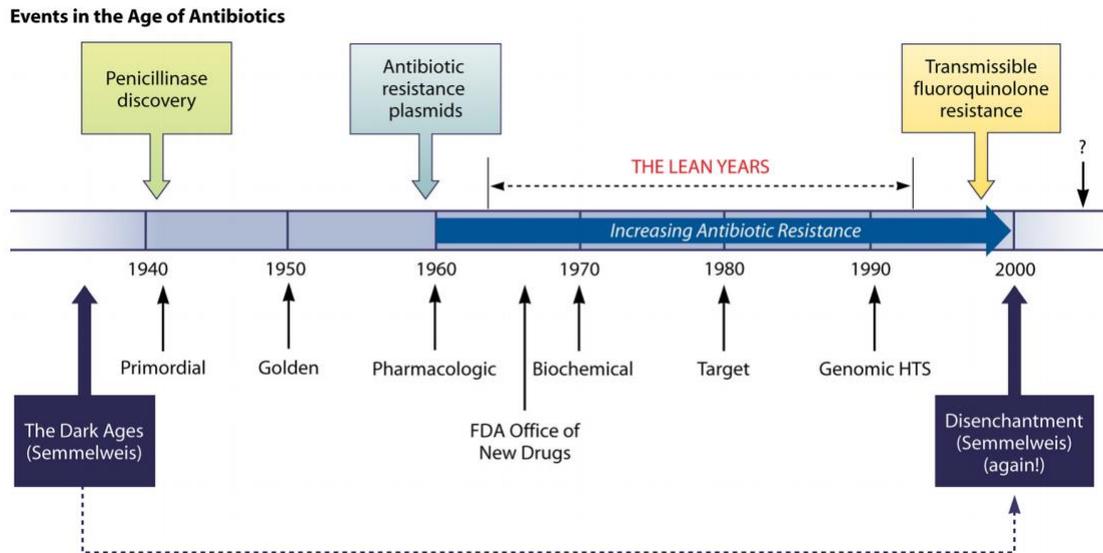


Figura 4. Acontecimientos importantes, cronología del descubrimiento de nuevos antibióticos y desarrollo de resistencia bacteriana.

Tomado de: (Davies & Davies, 2010)

En 1970 surgió la resistencia a polimixinas, las cuales fueron utilizadas en clínica para el tratamiento fibrosis quística hasta que se presentaron reacciones adversas en pacientes tratados con este tipo de antibióticos (Biswas, Brunel, Dubus, Reynaud-Gaubert, & Rolain, 2012).

En la actualidad, el surgimiento de bacterias multirresistentes se convirtió en un reto para la medicina humana y veterinaria (Iglesias Parro, 2018). Los antibióticos ejercen presión selectiva sobre los microorganismos, lo que provoca que estos mejoren su aptitud al adquirir genes de resistencia y factores como la pobreza, vivienda deficiente, suministro de agua deficiente, saneamiento deficiente, esorrentía de residuos agrícolas, contaminación ambiental y movimiento geográfico de humanos y animales infectados promueven la propagación de estas bacterias multirresistentes (Collignon, Beggs, Walsh, Gandra, & Laxminarayan, 2018).

Existen grandes depósitos de microorganismos multirresistentes en ambientes comunitarios, intrahospitalarios, granjas, entornos de acuicultura, entre otros (Marti, Variatza, & Balcazar, 2014).

Por otro lado, existen microorganismos con una resistencia intrínseca a los antibióticos, los cuales producen moléculas naturales que les han permitido sobrevivir y adaptarse (Valdés, 2017). Por otro lado, poblaciones bacterianas que inicialmente eran susceptibles a antibióticos y en la actualidad son resistentes se consideran de importancia investigativa. La resistencia adquirida puede ser el resultado de mutaciones en genes cromosómicos o puede deberse a determinantes genéticos externos de resistencia obtenidos a partir de microorganismos intrínsecamente resistentes (Munita & Arias, 2016).

2.2.2 Papel de los antibióticos en la salud pública

Los antibióticos son sustancias químicas, naturales o sintéticas, que en bajas concentraciones inhiben el crecimiento y propagación de microorganismos (Fymat, 2017). Los antibióticos se convirtieron en parte esencial de la medicina moderna desde su descubrimiento, hace más de 70 años (Laws, Shaaban, & Rahman, 2019). Ninguna otra clase de droga ha evitado de forma costo-eficiente los decesos por enfermedades causadas por microorganismos (Butler, Blaskovich, & Cooper, 2016), y permitió la incursión en procedimientos médicos como cirugías y tratamientos de quimioterapia, para combatir el cáncer (Singh & Barrett, 2006). En 1928, Alexander Fleming descubrió la penicilina, el primer antibiótico (Davies & Davies, 2010), después de este hito histórico se descubrieron y desarrollaron otros compuestos con propiedades antimicrobianas (Iglesias Parro, 2018). Pero, en la actualidad la producción de nuevos antibióticos ha decrecido significativamente, puesto que las principales farmacéuticas dejaron de dirigir sus recursos para la generación de los mismos (Cooper & Shlaes, 2011). Esto se debe a requisitos más estrictos para la seguridad de

medicamentos, lo que ralentizó el registro de nuevos compuestos con propiedades antimicrobianas (Davies & Davies, 2010).

Según la OMS, la resistencia a antibióticos se define como la capacidad de los microorganismos por generar mecanismos que impidan que estas sustancias actúen contra ellos, y se clasificó como una de las tres amenazas de salud pública más importantes del siglo XXI. Como consecuencia, los tratamientos habituales pierden su eficacia y las infecciones se transmiten de individuo a individuo (World Health Organization, 2014, 2017b).

Desafortunadamente el uso de los antibióticos fue subestimado, lo que provocó que las nuevas y antiguas formulaciones antibióticas sean ineficientes, debido al incremento de bacterias multirresistentes (Butler et al., 2016). Las mayores causas de resistencia son el uso excesivo de antibióticos en humanos debido a ventas sin receta, mayor incidencia de viajes internacionales; higiene y salubridad deficientes y poca adherencia a los tratamientos antibióticos profilácticos. Estos factores contribuyen a la presión selectiva para la aparición de bacterias multirresistentes en la comunidad; a lo que se debe sumar el consumo global de antibióticos en el ganado (Bilal et al., 2018).

2.2.3 Bases genéticas de resistencia antimicrobiana

Según Munita & Arias (2016), debido a su plasticidad genética, las bacterias tienen la capacidad de responder a una amplia gama de amenazas ambientales, como los antibióticos que amenazan su supervivencia. Las bacterias que comparten un nicho ecológico con microorganismos que presentan resistencia intrínseca, desarrollan los mismos mecanismos. Por lo tanto, se cree que, desde una perspectiva evolutiva las bacterias usan dos estrategias genéticas principales para inhibir la acción de los antibióticos.

2.2.3.1 Mutaciones cromosómicas

Dentro de una población susceptible a antibióticos un subconjunto de células bacterianas puede desarrollar mutaciones en genes que afectan a la efectividad del medicamento, lo que permite la supervivencia del microorganismo. De esta forma, el antibiótico solamente actuará contra las bacterias susceptibles de la población y predominarán las resistentes. En varias ocasiones, estas mutaciones representan un alto costo para la homeostasis celular y solo se mantienen en presencia del antibiótico (Munita & Arias, 2016).

2.2.3.2 Incorporación de ADN foráneo a través de la transferencia horizontal de genes (HGT por sus siglas en inglés)

Según Munita y Arias (2016) la adquisición de ADN extraño es una de las estrategias más importantes de la evolución bacteriana. El medio ambiente alberga determinantes genéticos intrínsecos de resistencia y existe una sólida evidencia de que esta es una fuente prolífica para que los microorganismos de importancia clínica adquieran resistencia a antibióticos. Las bacterias adquieren este material genético externo a través de tres mecanismos de HGT: transformación, transducción y conjugación (ver *Figura 5*).

1. **Transformación:** Incorporación de ADN desnudo. Sólo una parte de bacterias de importancia clínica pueden incorporar naturalmente ADN foráneo circundante, para adquirir resistencia (Manson et al.,2010).
2. **Transducción:** Transferencia de ADN de una célula a otra mediante la acción de un virus (bacteriófagos). Estos bacteriófagos, generalmente, en ciclo lisogénico al extirpar su genoma del cromosoma huésped llevan consigo genes de resistencia bacterianos empaquetados en las proteínas de recubrimiento del fago. Es así que,

cuando estos fagos reinfectan otras bacterias transfieren los genes de resistencia (Manson et al., 2010).

3. **Conjugación:** Método muy eficiente de transferencia de genes que implica el contacto de célula a célula y es muy probable que ocurra en altas tasas en el tracto gastrointestinal de los seres humanos bajo tratamiento con antibióticos. Para la conjugación se necesita de elementos genéticos móviles (plásmidos y transposones) que permiten la transferencia de genes de resistencia (Manson et al., 2010).

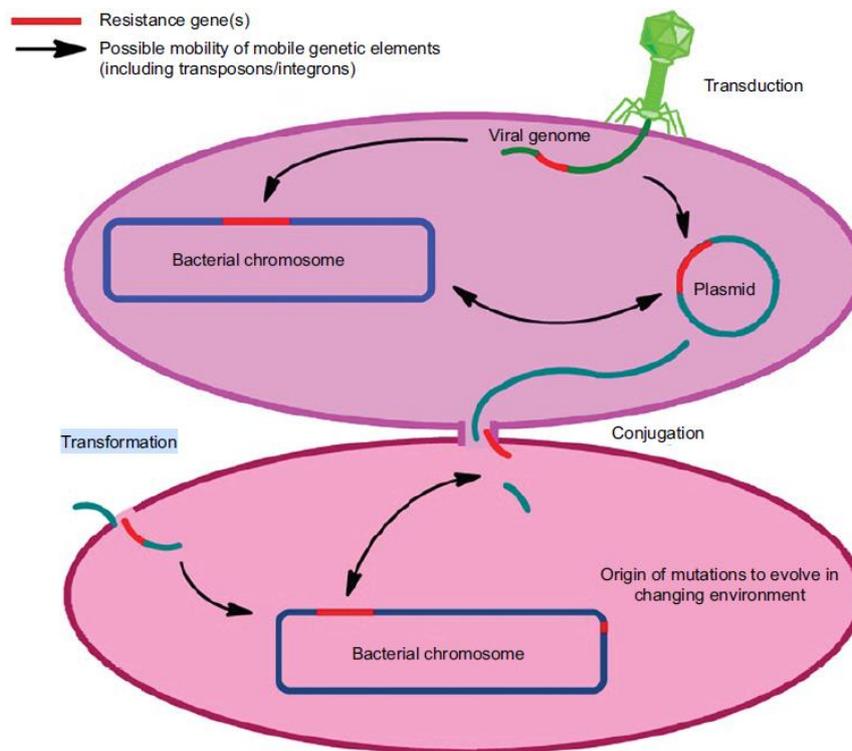


Figura 5. Mecanismos naturales de adquisición de material genético de importancia.

Tomado de: (Bilal et al., 2018)

2.2.4 Mecanismos generales de resistencia a antibióticos

2.2.4.1 Reducción de permeabilidad de la membrana

En el caso de bacterias Gram negativas muchos de los antibióticos usados actúan sobre la membrana externa; pero estas bacterias han desarrollado mecanismos para evitar que el antibiótico alcance su objetivo intracelular o periplásmico al limitar la entrada de sustancias del medio externo (Giedraitienė et al., 2011). De hecho, la membrana externa es la primera línea de defensa contra compuestos que pueden afectar a la supervivencia bacteriana. Antibióticos hidrofílicos como los β -lactámicos, tetraciclinas, y algunas fluoroquinolonas son los más afectados por los cambios en la permeabilidad de la membrana externa ya que a menudo hacen uso de porinas para cruzar esta barrera (Pagès et al., 2008).

2.2.4.2 Inactivación del antibiótico

Existen enzimas capaces de inactivar antibióticos como las β -lactamasas, enzimas modificadoras de aminoglucósidos y cloranfenicol acetiltransferasas, entre otras (Madigan et al., 2015). Estas enzimas introducen cambios químicos en las moléculas antibióticas, por medio de la catalización de reacciones bioquímicas entre las que se destacan la acetilación, fosforilación y adenilación. El efecto resultante se relaciona con un impedimento estérico que disminuye o anula completamente la acción que ejerce el antibiótico sobre el microorganismo diana (Munita & Arias, 2016).

2.2.4.3 Alteración de la diana

La alteración de la molécula objetivo afecta a la interacción entre la misma y el antibiótico, es una estrategia común desarrollada por las bacterias para evitar la acción del antibiótico (Munita & Arias, 2016). Este mecanismo antimicrobiano es tan específico que si existe algún tipo de modificación en la molécula objetivo la unión del antibiótico a esta se ve comprometida (Laws et al., 2019). Para lograr esto se han desarrollado tácticas que afectan a casi todas las familias de compuestos antimicrobianos. Estos cambios pueden consistir en mutaciones puntuales en genes que codifican la diana, alteraciones enzimáticas en el sitio de unión, reemplazo o derivación del objetivo original (Munita & Arias, 2016).

2.2.4.4 Bombas de expulsión

Las bombas de expulsión son capaces de mantener fuera del citoplasma un compuesto tóxico para la célula; pero también, pueden ser causa de resistencia a antibióticos (Giedraitienė et al., 2011). Hasta la fecha se han caracterizado patógenos de importancia clínica con diferentes bombas de expulsión que tienen sistemas específicos del sustrato que generalmente se encuentran en bacterias multirresistentes (Poole, 2005).

2.3 Antibióticos de importancia crítica en medicina humana para el tratamiento de bacterias multirresistentes

Desde 2005, la OMS clasifica a los antibióticos que se han utilizado tanto en medicina humana, como veterinaria en función de su importancia y prioridad, para el tratamiento contra bacterias multirresistentes. Este listado se actualiza periódicamente y tiene como objetivo contribuir a la gestión sobre la resistencia a antibióticos y busca garantizar que estas sustancias se administren de forma

prudente, tanto en la medicina humana, como en la medicina veterinaria (World Health Organization, 2017).

Estos fármacos se clasifican como: antibióticos de importancia crítica (se subclasifican en antibióticos de máxima prioridad y gran prioridad), antibióticos altamente importantes y antibióticos importantes, en base a dos criterios claves (World Health Organization, 2018).

- **Criterio 1:** La clase antimicrobiana es la única o una de las pocas terapias para tratar infecciones graves en personas.
- **Criterio 2:** La clase antimicrobiana se usa para tratar infecciones causadas por bacterias que se transmiten desde fuentes no humanas y para combatir bacterias que adquieren genes de resistencia por transferencia horizontal.

Según la World Health Organization (2018) la clasificación de los antimicrobianos se da de la siguiente manera:

- **De importancia crítica:**
 - **Antibióticos de máxima prioridad:** Cefalosporinas (3^{era}, 4^{ta}, 5^{ta} generación), glucopéptidos, macrólidos y cetólidos, quinolonas y polimixinas.
 - **Antibióticos de gran prioridad:** Aminoglucósidos, ansamicinas, carbapenémicos y otros penémicos, lipopéptidos, glicilciclinas, penicilinas (naturales, aminopenicilinas y antipseudomonales), monobactámicos, oxazolidinonas, derivados del ácido fosfórico y

fármacos utilizados para el tratamiento de tuberculosis u otras enfermedades causadas por micobacterias.

- **Altamente importantes:** Amidinopenicilinas, anfenicoles, cefalosporinas (1^{era} y 2^{da} generación) y cefamicinas, lincosamidas, penicilinas (antiestafilocócicas), ácidos pseudomónicos, riminofenizimas, antibacterianos esteroideos, estreptograminas, sulfonamidas, inhibidores de la dihidrofolato-reductasa y combinaciones, sulfonas y tetraciclinas.
- **Importantes:** Aminociclitolos, polipéptidos cíclicos, nitrofurantoínas, nitroimidazoles, pleuromutilinas”.

Para los antibióticos denominados “de importancia crítica” se asignan recursos con prioridad, debido a que se necesita con mayor urgencia establecer estrategias de gestión de riesgos (World Health Organization, 2018).

2.4 Polimixinas

Las polimixinas son metabolitos secundarios no ribosomales (Biswas et al., 2012) aislados a partir de la bacteria Gram positiva presente en el suelo, *Paenibacillus polymyxa* subsp. *colistinus* (Benedict & Langlykke, 1947). A lo largo de la historia se han aislado cinco tipos de polimixinas diferentes clasificadas con siglas desde A hasta E (Landman et al., 2008), de las cuales solo la polimixina B y la polimixina E (colistina) se han utilizado comercialmente, puesto que se ha demostrado que son los dos compuestos activos contra bacterias Gram negativas menos tóxicos para la salud humana dentro de este grupo de antibióticos (Satlin & Jenkins, 2017).

La estructura química de todas las polimixinas es semejante a péptidos catiónicos antimicrobiano entre los que se destacan defensinas y gramicidinas

antibióticos utilizados por células eucariotas al verse colonizadas por bacterias (Hancock & Chapple, 1999).

2.4.1 Colistina

Según Medina en el 2017, la colistina es un polipéptido cíclico largo cargado positivamente con un peso molecular de 1750 Da (Storm, Rosenthal, & Swanson, 1977). Este antibiótico está conformado por un decapeptido enlazado a una cadena de ácidos grasos en el extremo N-terminal (Velkov et al., 2014). Dentro de su estructura química, como la mayoría de otros péptidos antibióticos, la colistina está formada por residuos catiónicos como el *ácido L- α - γ -diaminobutírico* (Dab) (cargados positivamente) y dos dominios hidrofóbicos (ácido graso N-terminal y el segmento D-Leu-L-Leu) (Yu et al., 2015). Otro aspecto remarcable es que por medio de un análisis tridimensional se reveló que este antibiótico se pliega para formar dos caras distintas: una para los dominios polares, y otra para los hidrofóbicos, lo que provoca que este fármaco sea anfipático, propiedad quimio-física esencial para la actividad antibacteriana de la colistina (Velkov et al., 2010). El extremo N-terminal acilado por una cola de ácidos grasos aparte de conferir hidrofobicidad a la molécula, también es el responsable de su toxicidad e influye inherentemente en la actividad antimicrobiana de la molécula (Brink et al., 2014).

Como se puede observar en la *Figura 6*, la colistina y la polimixina B, en su configuración difieren en un solo aminoácido (D-fenilalanina reemplaza a D-leucina para la colistina) (Aguayo et al., 2016). Esta diferencia estructural entre ambas moléculas provoca que la administración de la polimixina B (antibiótico en forma activa) y la colistina (CMS, profármaco inactivo) sean diferentes (Iglesias Parro, 2018).

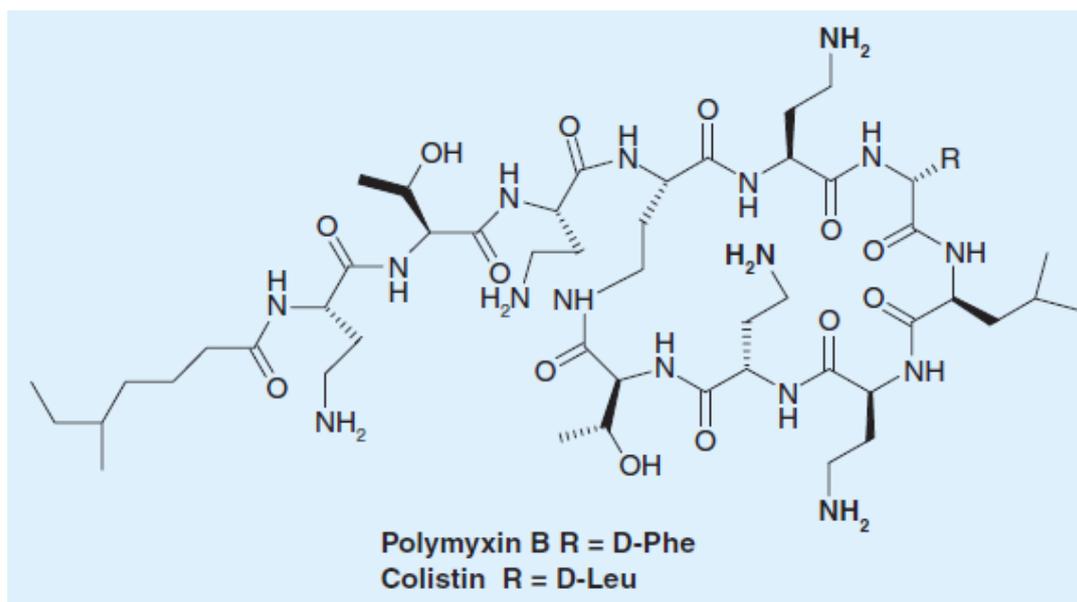


Figura 6. Estructura básica de las polimixinas. Se evidencia el polipéptido cíclico unido al ácido graso N-terminal. El radical R (posición 6) indica los dos aminoácidos que distinguen entre la polimixina B y la colistina.

Tomado de: (Biswas et al., 2012)

Por lo tanto, para usos comerciales existen dos formas de colistina: sulfato de colistina (uso tópico y oral) y colistimetato de sodio (CMS) (uso parenteral) (Giamarellou & Poulakou, 2009). En clínica, la formulación farmacéutica de la colistina es la molécula inactiva CMS (Aguayo et al., 2016) que es menos tóxica para la administración parenteral (Li, Nation, et al., 2006), puesto que se transforma a colistina por una reacción de sulfometilación en medio acuoso, ya sea *in vitro* o *in vivo*, (Nation et al., 2016).

2.4.1.1 Espectro de acción

El espectro antimicrobiano de la colistina es reducido, ya que actúa contra la mayoría de bacterias patógenas fermentativas Gram negativas como *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella*

spp., pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae (Falagas & Kasiakou, 2005). También ejerce efecto sobre bacterias Gram negativas no fermentativas como *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *S. maltophilia* (Li et al., 2005).

Sin embargo, existen especies bacterianas que presentan resistencia intrínseca al antibiótico como *Providencia* spp., *Neisseria* spp., *Proteus* spp., *S. marcescens*, *B. cepacia*, *M. morganii* (Falagas et al., 2010).

La colistina y las otras polimixinas no muestran actividad sobre microorganismos eucariotas como hongos y parásitos (Falagas & Kasiakou, 2005), y tampoco contra cocos (Gram negativos y Gram positivos), bacilos Gram positivos y bacterias anaerobias (Poirel et al., 2017; Tan & Ng, 2006).

2.4.1.2 Mecanismo de acción de la colistina frente a Enterobacterias

El efecto bactericida de la colistina es extremadamente rápido y es similar al de un detergente; y aunque el LPS es el objetivo inicial, el mecanismo exacto de acción no está totalmente dilucidado (Bialvaei & Samadi Kafil, 2015; Poirel et al., 2017). Entre la polimixina B y la colistina; la colistina es el antibiótico más usado a nivel mundial debido a su mejor disponibilidad (Lee & Doi, 2014).

Para comprender el mecanismo de acción de las polimixinas propuesto por varios autores es esencial conocer que el Mg^{2+} y el Ca^{2+} son cationes divalentes que están asociados a la capa LPS y tienen una función estructural importante al unir y estabilizar las moléculas de LPS adyacentes (Hancock, 1997).

En consecuencia, la membrana externa es una barrera mecánica y electrostática con una carga aniónica elevada conferida por los fosfatos y carboxilatos

presentes en la estructura del lípido A, y los azúcares que conforman el LPS (núcleo polisacárido y polisacárido O específico), respectivamente (Aguayo et al., 2016). Las interacciones entre los cationes y la capa LPS producen una membrana externa rígida y fuerte; sin embargo, esta puede verse afectada por la acción de antibióticos como las polimixinas o la eliminación de iones Mg y Ca mediado por EDTA (Murray et al., 2014).

Como se mencionó anteriormente, el sitio diana de las polimixinas es el lípido A (estructura más interna del LPS), y para su acción es fundamental la naturaleza anfipática que posee la molécula (Aguayo et al., 2016). Las polimixinas a pH fisiológico 7,4 se vuelven policationicas (Velkov et al., 2014) y ejercen su efecto a través de un mecanismo de dos pasos.

Primeramente, la colistina al estar cargada positivamente es atraída hacia la capa LPS (cargada negativamente) de la bacteria por fuerzas electrostáticas, lo que conlleva al desplazamiento de los cationes divalentes Mg^{2+} y Ca^{2+} . Esto provoca la alteración de la membrana externa y su desestructuración (Dixon & Chopra, 1986). En segundo lugar, la molécula antimicrobiana se inserta en la membrana externa de la bacteria por medio de sus segmentos hidrófobos (N-terminal ácido graso y el segmento D-Leu-L-Leu del antibiótico) (Yu et al., 2015), en consecuencia la permeabilidad de la membrana incrementa por el deterioro del ensamblaje de los fosfolípidos (Aguayo et al., 2016), lo que provoca la fuga de componentes del espacio periplásmico. Posteriormente, por mecanismos aún no dilucidados se produce la fusión de la cara interna de la membrana externa con la superficie de la membrana citoplasmática permitiendo así, la fuga de los componentes del citoplasma, lo que provoca finalmente, la muerte de la bacteria (Hancock & Chapple, 1999) (ver *Figura 7*).

Cabe destacar que el proceso de disrupción de la membrana es independiente de la entrada de polimixinas en la célula (Gales et al., 2012) y parece inhibirse en presencia de estos cationes bivalentes (Falagas et al., 2010).

Entre otras consideraciones, a más de provocar la fuga de componentes del citoplasma y la lisis celular, la unión entre la colistina a la membrana externa de la bacteria tiene un efecto neutralizante sobre las propiedades biológicas del lípido A (Landman et al., 2008) y esto previene un choque por la liberación de la endotoxina (Martis, Leroy, & Blanc, 2014).

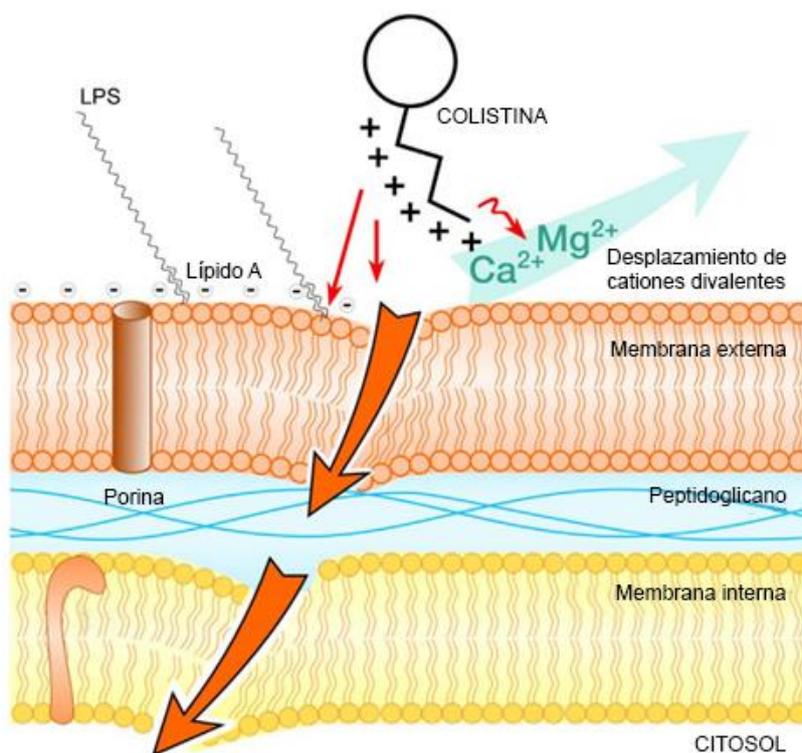


Figura 7. Mecanismo de acción de la colistina en la membrana externa de bacterias Gram negativas. Se evidencia el desplazamiento de cationes divalentes, lo que provoca cambios en la permeabilidad de la membrana y permite la acción del antibiótico.

Adaptado de: (Martis et al., 2014)

2.4.1.3 Uso de colistina en medicina humana

La colistina fue reconocida como antibiótico en 1950 y, en esta década fue utilizada en China y Europa. En 1959 que se aprobó su comercialización por la “Food and Drug Administration” (FDA) en Estados Unidos, y a partir de ese año el CMS reemplazó a la colistina en la administración parenteral (Bialvaei & Samadi Kafil, 2015), para el tratamiento de enfermedades infecciosas provocadas por bacterias Gram negativas (Biswas et al., 2012). En 1970, después de una década de uso, la administración de este antibiótico se discontinuó en la clínica, puesto que demostró provocar neurotoxicidad y nefrotoxicidad (Kempf et al., 2013), siendo reemplazado por antibióticos como aminoglucósidos, quinolonas y β -lactámicos, más activos frente a bacterias Gram negativas y menos tóxicos para la administración en humanos (Bialvaei & Samadi Kafil, 2015). Recientemente, la colistina fue reintroducida en el circuito clínico para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias multirresistentes a carbapenemas y beta-lactámicos (Kempf et al., 2013). Desafortunadamente, esto llevó a comprender la importancia de este antibiótico para la salud pública (Satlin & Jenkins, 2017), ya que se consideran un tratamiento alternativo final para infecciones causadas por bacterias multirresistentes como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, entre otras (Falagas & Kasiakou, 2005).

2.4.1.3.1 Efectos adversos de colistina en humanos

Como se había mencionado anteriormente, la colistina al ser administrada en humanos, tiene varios efectos adversos como: neurotoxicidad, nefrotoxicidad (Falagas & Kasiakou, 2005; Kasiakou et al., 2005; Kempf et al., 2013; Landman et al., 2008; Li et al., 2005; Nation et al., 2016) y bloqueo neuromuscular (apnea) entre las principales secuelas con consecuencias comúnmente fatales (Sinirtas, Akalin, & Gedikoğlu, 2009).

Según Koch-Weser y colaboradores (1970), la toxicidad renal incluye la necrosis tubular aguda, ya que la colistina induce a permeabilidad celular. Por otro lado, la neurotoxicidad se asocia a debilidad, mareos, vértigo, trastornos visuales, confusión, ataxia, entre otras cosas. Tanto la toxicidad renal, como la neurológica son dependientes de la dosis y en general reversibles, una vez que se interrumpe de forma temprana el tratamiento (Ordooei et al., 2015). En particular, de acuerdo a estudios realizados por Pogue y colaboradores en 2011, los daños renales causados por colistina, pueden tener efectos irreversibles.

El uso de colistina, como se mencionó anteriormente, fue prohibido en 1970; pero se mantuvo para el tratamiento de la fibrosis quística (Falagas & Kasiakou, 2005).

Actualmente, se sabe que la toxicidad provocada por la colistina es menos común y grave; sin embargo, aún existen efectos adversos por administración de dosis altas del antibiótico, A pesar de estos efectos negativos, es importante aclarar que las muertes atribuidas a la terapia con colistina son menores al 5% (Martis et al., 2014).

2.4.1.4 Uso de colistina en medicina veterinaria

En medicina veterinaria el uso de colistina ha sido vasto desde su descubrimiento (Falagas & Kasiakou, 2005). Este medicamento se ha empleado para combatir infecciones del tracto gastrointestinal, producidas por Enterobacterias (Koch-Weser et al., 1970). La bacteria responsable de la mayoría de infecciones documentadas en animales productores de alimentos es *E. coli*, puesto que produce diarreas, septicemia, y colibacilosis, entre otras afecciones (Kempf et al., 2013). Por otra parte, el consumo de la colistina en animales se da principalmente por administración oral, en donde, muchas veces, las

presentaciones comerciales están compuestas por más de un antibiótico (Catry et al., 2015).

En países europeos el uso de colistina para la cría animal ha sido extenso (Catry et al., 2015). En Francia, para la cría de cerdos la colistina es administrada con los alimentos durante, y después del destete. Además, se ha establecido que un tercio de la exposición de estos animales a antibióticos se atribuye a la colistina. En este estudio se constató que el 93-95% de las granjas utilizaron colistina solo para la administración oral, 90% usaron el antibiótico durante el período de destete y 19% lo usaron para completar la última fase de crecimiento del animal. Esta tasa resultó ser mayor en aves de corral (Chauvin, 2010).

En Europa, mientras que las ventas de otros antimicrobianos se estandarizaron en relación al peso total del animal (European Medicines Agency, 2013), la colistina fue el antibiótico más vendido después de las tetraciclinas, sulfonamidas y macrólidos (Catry et al., 2015) y no se produjo ninguna regulación para su uso, por lo que se produjo su sobredosificación en animales (Timmerman et al., 2006). Por otro lado, cabe recalcar que en algunos países no europeos está autorizado el uso de colistina como aditivo para alimentación (Kempf et al., 2013).

La World Organization for Animal Health (OIE) (2018) realizó una recopilación de datos presentados por 18 países en la región de las Américas de 2015 a 2017. En la *Figura 8* se muestra el número de países que tuvieron previsto el uso de antibióticos en animales productores de alimentos. Los 18 países concentran el uso de antibióticos en animales como aves de corral, bovinos, ovejas y cabras, y cerdos.

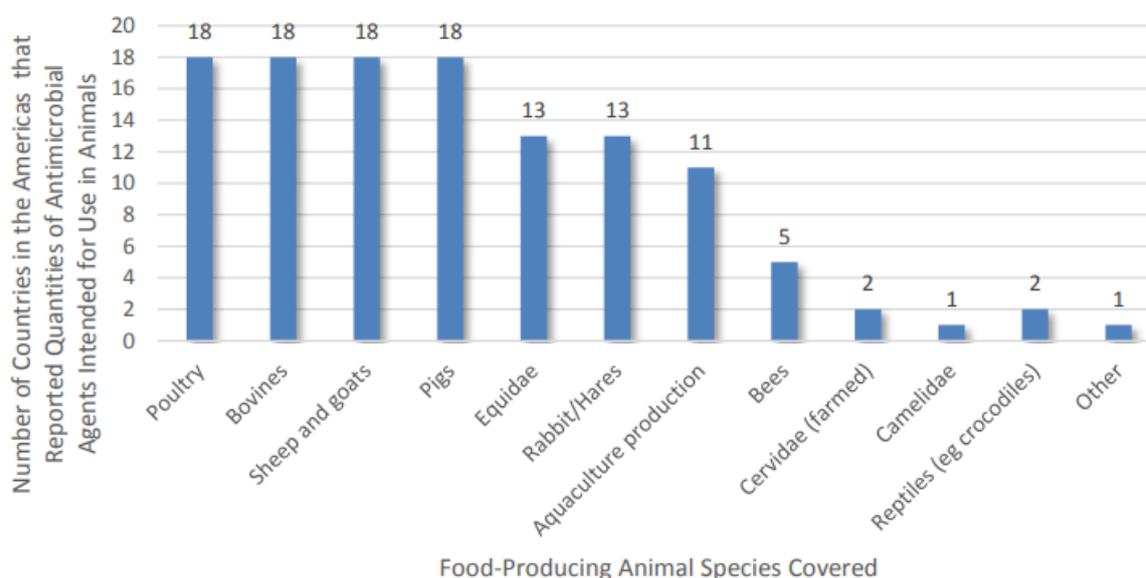


Figura 8. Especies animales productoras de alimentos provenientes de notificaciones de 18 países de la región de las Américas (Período 2015 a 2017).

Tomado de: (World Organization for Animal Health, 2018)

En el reporte anual de la OIE (2018) de los 30 países miembros pertenecientes a las Américas el 60% (18 países) usaron agentes antimicrobianos como promotores de crecimiento. De estos, solo 15 países proporcionaron una lista de los antimicrobianos más comercializados para la promoción de crecimiento en animales.

En la *Figura 9* se puede observar que los agentes más usados son los polipéptidos (colistina, bacitracina, polimixina B, entre otros), seguido de glucofosfolípidos (flavomicina).

Las Américas son la región de la OIE con mayor número de países que informan la falta de legislación o regulación para los antimicrobianos como promotores de crecimiento.

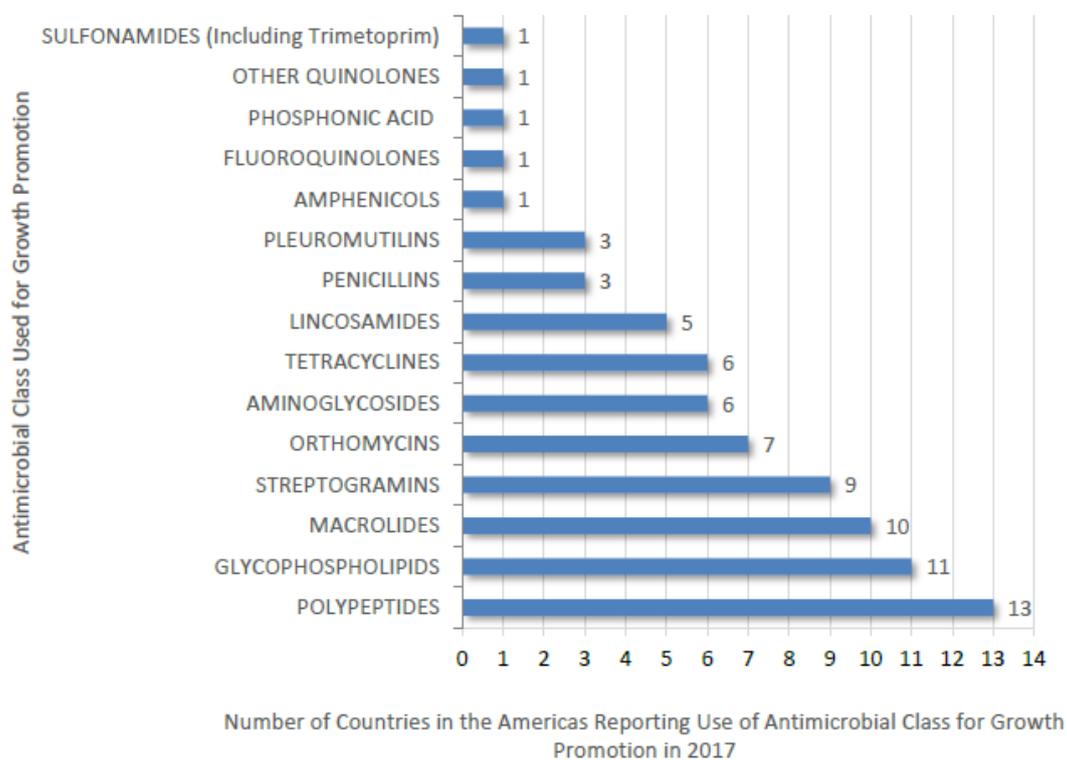


Figura 9. Antibióticos utilizados como promotores de crecimiento en 15 países pertenecientes a la OIE, en 2017.

Tomado de: (World Organization for Animal Health, 2018)

Recientemente, por el incremento de infecciones atribuidas a bacterias Gram negativas multirresistentes, la aparición de mecanismos de resistencia (transferencia horizontal del genes de resistencia) en cepas de Enterobacterias, resistencia a aminoglucósidos y carbapenemas, el uso de colistina fue reevaluado (Biswas et al., 2012; Iglesias Parro, 2018).

En 2012, en China se prohibió la venta de colistina como aditivo alimentario para el crecimiento de animales, y la European Medicines Agency (EMA) (2013) recomendó el uso responsable del antibiótico y limitar completamente su empleo en animales enfermos, para profilaxis o metafilaxis.

2.5 Mecanismos bacterianos de resistencia a colistina

Existen dos tipos de mecanismos de resistencia a la colistina, los cuales consisten en resistencia adquirida (Yu et al., 2015). El primero se base en mutaciones cromosómicas, principalmente de los sistemas de dos componentes *phoP/phoQ* y *pmrA/pmrB*, y el segundo se da debido a la transferencia horizontal de genes (gen *mcr*) (Olaitan et al., 2014).

2.5.1 Mutaciones cromosómicas de resistencia a colistina

En la *Figura 10* se explican las modificaciones en el LPS para generar resistencia a colistina. Normalmente, MgrB (codificada por *mgrB*) y MicA (en *E. coli*) ejercen retroalimentación negativa sobre el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ; pero cuando existen mutaciones (denotadas por estrellas de color rojo) en *mgrB* o *phoP/phoQ* se induce a la expresión constitutiva de dicho sistema. Una vez fosforilado PhoP este activa a *pmrD*, que a su vez activa al sistema de dos componentes *pmrA/pmrB* (Cannatelli et al., 2013). Al mismo tiempo, se activan *pagL* (deacilación del lípido A) y MgrR que reprime a *eptB* y evita la expresión de fosfoetanolamina (PEtN) impidiendo la modificación del KDO (Olaitan et al., 2014).

El sistema de dos componentes *pmrA/pmrB* puede activarse por medio de mutaciones o por la acción de *pmrD*. Una vez fosforilado, PmrA activa al operón *arnBCADTEF* y gen *pmrE* responsables de añadir 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa (L-Arab4N) al LPS (Gunn et al., 1998; Tamayo et al., 2005). El lípido A y el núcleo LPS se modifican también con PEtN por el operón *pmrCAB* y el gen *cptA*, respectivamente. Los genes adicionales activados por *pmrA* incluyen *pmrR*, reprime a *lpxT* (fosforilación del lípido A) tras la activación del gen *lpxR* (desacila el lípido A). Por último, *etK* realiza una fosforilación adicional en el gen *pmrE*. Por

medio de esta cascada de reacciones, se produce la modificación del LPS, lo cual afecta a la sensibilidad de las colistinas, evitando la atracción electrostática (Olaitan et al., 2014).

Es importante destacar que el sistema regulador de genes *phoP/phoQ* puede activar directamente el operón *arnBCADTEF* en *K. pneumoniae*. De hecho, este es el mecanismo de resistencia a colistina más expresado en esta bacteria (Cannatelli et al., 2013).

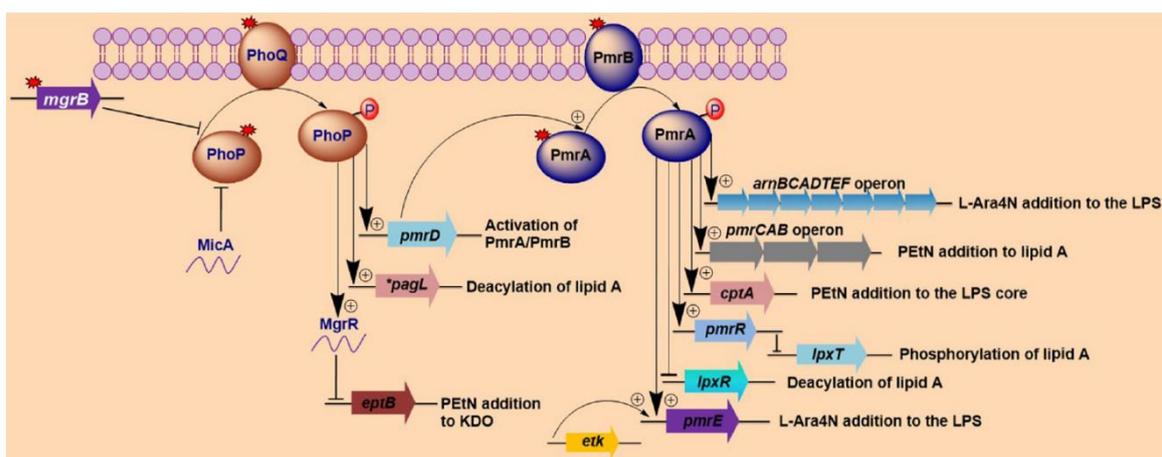


Figura 10. Activación de genes modificadores de LPS, implicados en la resistencia a la colistina en bacterias Gram negativas.

Tomado de: (Olaitan et al., 2014)

2.5.2 Transferencia horizontal de genes (gen *mcr*)

Anteriormente se tenía conocimiento de que la resistencia a colistina se producía por mutaciones cromosómicas, hasta que en 2016 Liu y colaboradores reportaron el primer gen de naturaleza plasmídica que confiere resistencia a la colistina, *mcr-1*.

Los genes *mcr* (incluidas las variantes) codifican enzimas PEtN que son las responsables de la modificación del LPS, mediante su adición al lípido A lo que disminuye la carga negativa del LPS (Iglesias Parro, 2018). Por lo tanto, de evitar la atracción electrostática entre la colistina y su diana (Aghapour et al., 2019).

Después de este descubrimiento, 8 variantes fueron descritas en el período 2016-2018. Los genes *mcr-2* en Bélgica (Xavier et al., 2016) (y España), *mcr-3* en China (Yin et al., 2017) (y Brasil, Dinamarca, Francia, Alemania, Japón, España y Tailandia), *mcr-4* en Italia (Carattoli et al., 2017) (y España), *mcr-5* en Alemania y Brasil (Borowiak et al., 2017; Quiroga et al., 2018) (y Colombia, Japón y España), *mcr-6* y *mcr-7* que se anotaron y depositaron en la base GenBank, *mcr-7.1* (Yang et al., 2018) y *mcr-8* en China (Xiaoming Wang et al., 2018). El gen *mcr-9* fue descrito en Estados Unidos, en 2019 por Carroll y colaboradores.

A tres meses del descubrimiento del gen *mcr-1*, Skov & Monnet (2016) informaron que este ya se había diseminado a dos continentes (Europa y África) en base a datos obtenidos de bacterias aisladas de animales productores de alimentos (*Figura 11*).

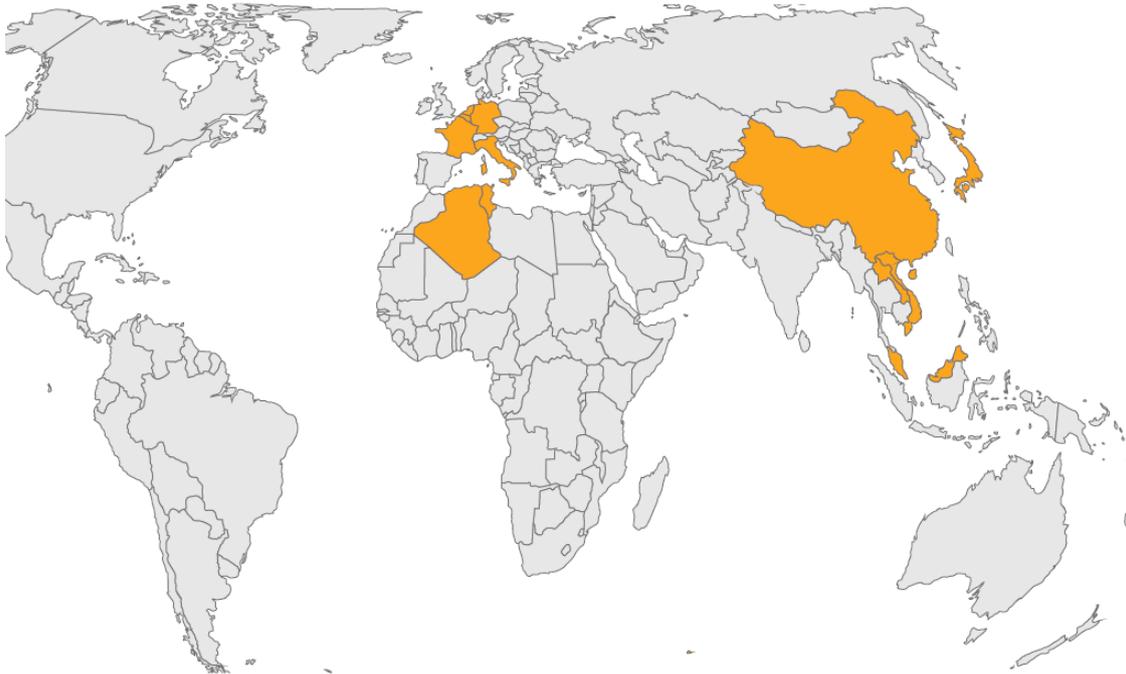


Figura 11. Distribución del gen *mcr* en los continentes africano y europeo en animales productores de alimentos, hasta marzo de 2016.

Tomado de: (Skov & Monnet, 2016)

En cuanto a humanos, se puede observar en la *Figura 12* que el gen *mcr-1* se esparció desde Europa hacia América. Cabe destacar que se encontraron casos clínicos y de portadores humanos asintomáticos, incluidos viajeros (Arcilla et al., 2016). Cabe destacar que para este año, Ortega-Paredes et al (2016) reportaron el primer aislado clínico de *E. coli* portadora del gen *mcr-1* en Ecuador.



Figura 12. Distribución del gen *mcr* en los continentes africano y europeo en humanos, hasta marzo de 2016.

Tomado de: (Skov & Monnet, 2016)

Con este precedente se demostró que el gen *mcr* es altamente transferible con tasas de transferencia *in vitro* tan altas como 10^{-1} (Skov & Monnet, 2016).

En 2019, Elbediwi y colaboradores informaron en su revisión sistemática y meta-análisis, la carga global de bacterias resistentes a colistina hasta el año 2018. Entre los resultados de esta investigación se destaca la distribución global de los genes *mcr* en relación con los hospederos, bacterias y tipos de plásmidos que mostraron una segregación geográfica significativa (*Figura 13*).

De las 202 publicaciones analizadas, 5191 cepas albergaron genes *mcr*, de los cuales 4917 fueron del tipo *mcr-1* y los 274 restantes pertenecieron a otros genes *mcr*. Además, en la *Figura 14* se puede observar que las cepas de *E. coli* patogénicas (*P. E. coli*) provenientes de animales fueron las más frecuentes en

todo el mundo. Y la mayor incidencia de genes *mcr* provienen de *E. coli* no patogénicas (Non *P. E. coli*) aisladas de humanos. Los plásmidos IncI2 (34%) fueron los plásmidos más frecuentemente reportados (Elbediwi et al., 2019).

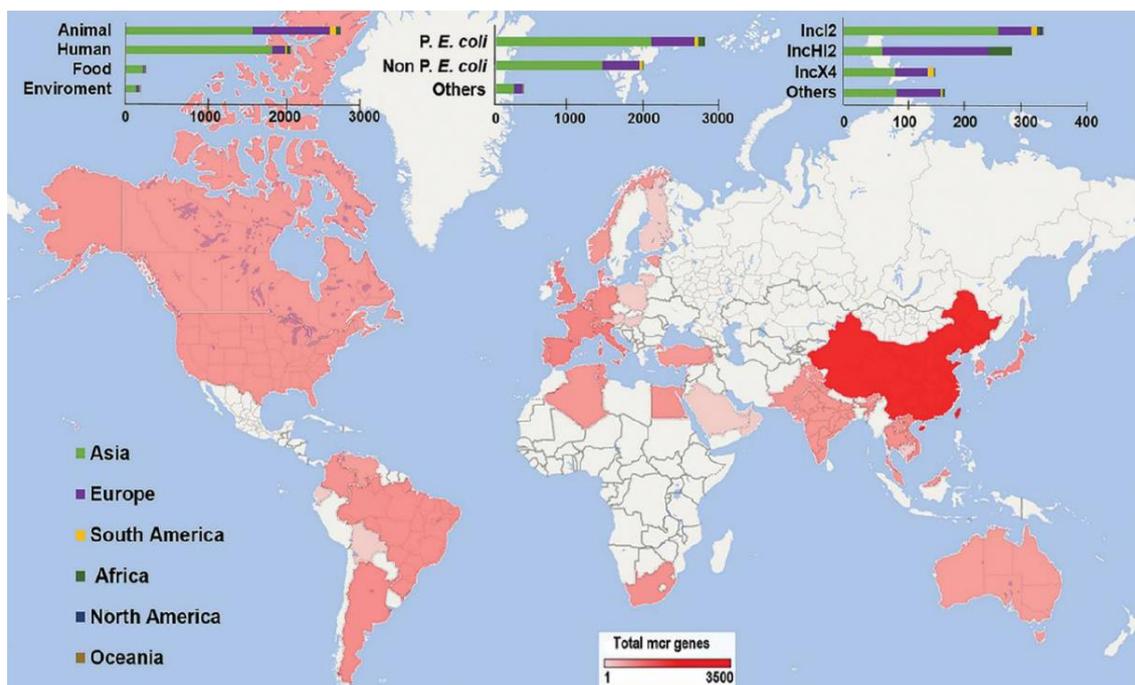


Figura 13. Visión global de los genes *mcr* junto con los diferentes tipos de huéspedes, bacterias y plásmidos. Los países en color blanco aún no han informado estudios sobre este gen.

Tomado de: (Elbediwi et al., 2019)

El gen *mcr-1* proveniente de *E. coli* patogénicas es el más común a nivel mundial con una prevalencia del 95% y el 5% restante corresponde a otras variantes de este gen (*Figura 14A*). Los hospederos que albergan este gen son animales mayoritariamente (53%), seguido de aislados clínicos (39%), alimentos (5%) y el ambiente (3%) (*Figura 14B*) (Elbediwi et al., 2019).

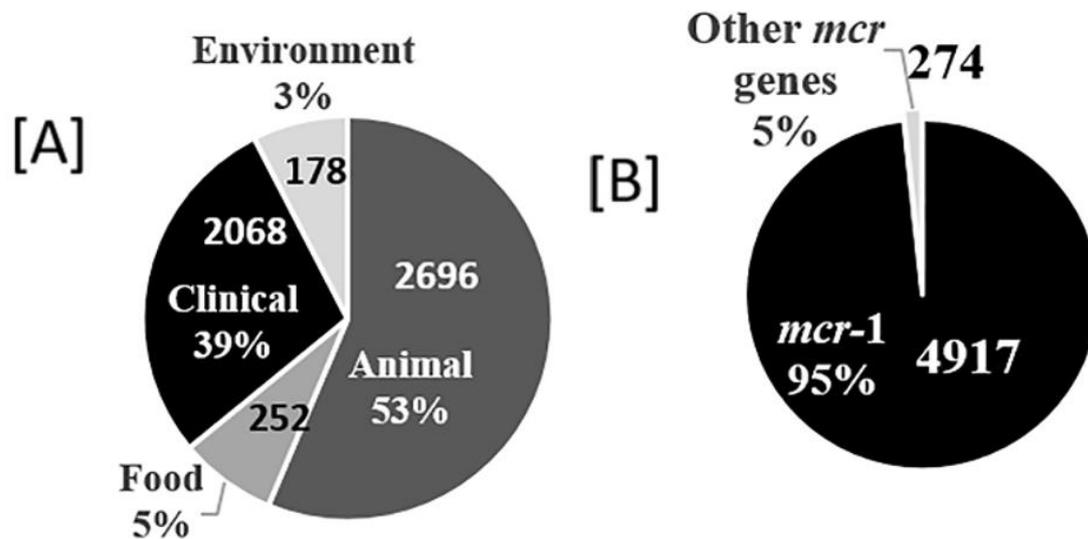


Figura 14. Frecuencia y distribución de genes *mcr* según hospederos y variantes del gen.

Adaptado de: (Elbediwi et al., 2019)

A) Hospederos que albergan genes *mcr*

B) tipos *mcr*

La diseminación del gen *mcr* en América Latina y el Caribe se muestra en la Figura 16, en donde se puede apreciar que el país con mayor prevalencia (44,7%) de es Brasil, seguido de Bolivia (31,6%), Argentina (18,4%), Uruguay (3,6%), Colombia (2,4%), Perú (1,2%), Venezuela (0,5%).

Países como Ecuador, Chile, Paraguay y México presentaron el menor número de casos (Figura 15) (Mendes Oliveira, Paiva, & Lima, 2019).



Figura 15. Distribución del gen *mcr* en América Latina y el Caribe, según la especie y el origen de los aislamientos.

Tomado de: (Mendes Oliveira et al., 2019)

A pesar de que Liu y colaboradores reportaron el gen *mcr* formalmente en 2016, se planteó la hipótesis de que estos genes existían mucho antes. Esto se ve respaldado por el descubrimiento del primer *mcr-3* en Alemania, lo que sugiere que estos genes existen hace más de 12 años (Eichhorn et al., 2018).

2.6 Acciones a mitigar o prevenir resistencia bacteriana

2.6.1 Enfoque Una Salud

El enfoque “Una Salud” es definido por la OMS como un movimiento multisectorial para la implementación de programas, legislación, política e investigación para que la salud pública no se vea amenazada. El enfoque de “Una Salud” aborda áreas importantes de la salud como la seguridad alimentaria, zoonosis y la resistencia a antibióticos (World Health Organization, 2017c).

Los orígenes de este enfoque tienen siglos de antigüedad y se basan en la interdependencia mutua de personas, animales y el medio ambiente, y en el reconocimiento de que a más de compartir un mismo entorno, también muchas enfermedades infecciosas (Zinsstag et al., 2012).

El uso excesivo de antimicrobianos está ocurriendo en los sectores humano, animal y en la agricultura (O'Neill, 2014). Por esto organizaciones como WHO, FAO y OIE, junto con varios países han iniciado la acción sobre el desarrollo de planes para tratar la crisis de resistencia a los antibióticos (World Health Organization, 2015; World Organization for Animal Health, 2016).

Los objetivos planteados por la World Health Organization (2015) Para abordar el problema son los siguientes:

1. Mejorar la conciencia y la comprensión de la resistencia a los antimicrobianos a través de una comunicación, educación y capacitación efectivas.

2. Fortalecer la base de conocimiento y evidencia a través de la vigilancia y la investigación.
3. Reducir la incidencia de infección a través de medidas eficaces de saneamiento, higiene y prevención de infecciones.
4. Optimizar el uso de medicamentos antimicrobianos en la salud humana y animal.
5. Desarrollar el caso económico para una inversión sostenible que tenga en cuenta las necesidades de todos los países y aumentar la inversión en nuevos medicamentos, herramientas de diagnóstico, vacunas y otras intervenciones.

3. Capítulo III. Procedimientos

3.1 Población y muestra

Debido a que el tamaño de la población era desconocido, se asumió que esta es infinita (más de 100 000 individuos) (Triola, 2018). En base a esto, el tamaño de la muestra se calculó en el programa epiinfo™ StatCalc con una frecuencia esperada de 47%, basada en la prevalencia de resistencia a colistina en humanos del reporte de Yamamoto y colaboradores (2019) con un rango de error del 5% y un X alfa/2 de 1,96. Además, el nivel de confiabilidad fue del 95%.

El tamaño muestral obtenido por el programa epiinfo™ StatCalc fue de 383 hospederos. Sin embargo, tras el muestreo se logró sobrepasar el tamaño muestral calculado llegando a un total de 438 hospederos. La fórmula para el

cálculo de la muestra de poblaciones infinitas utilizada por el programa epiinfo™ StatCalc es la siguiente:

$$n = \frac{Z^2 x(1 - P)P}{e^2}$$

Donde:

Z²: Nivel de confianza, 95%

P: Proporción esperada, 50% obtenido de Yamamoto et al., 2019

e²: Margen de error 5%

3.2 Área de estudio

Las muestras fecales de cerdos, aves de corral y humanos fueron obtenidas de localidades rurales tropicales de Ecuador como La Reforma, Santo Domingo de los Tsáchilas (región costa), San José y Samasunchi, Pastaza (región oriental) (*Figura 16*).



Figura 16. Área de estudio. Las muestras fueron obtenidas de localidades rurales de Santo Domingo y Pastaza, Ecuador.

3.3 Toma de muestras

3.3.1 Recolección de muestras de humanos

El modelo experimental planteado por esta investigación, fue avalado por el Comité de Bioética de la USFQ (código P2019-117E) (*Anexo 1*). Se procedió a

la visita en campo de las poblaciones en mención para la capacitación y donación de los frascos recolectores de heces. Posteriormente, se explicó la forma correcta de recolección de las muestras a los participantes del estudio, quienes voluntariamente accedieron a la toma de muestras, después de haber leído y firmado el correspondiente consentimiento informado (*Anexo 2*).

Después de la obtención de las muestras fecales en frascos colectores, estas se traspasaron a tubos con medio semisólido *Cary-Blair* (Eiken Chemical, Tokyo, Japan) mediante un hisopo estéril, para el transporte a 4°C hasta su llegada a los laboratorios de la Universidad de las Américas, en Quito.

3.3.2 Recolección de muestras de animales de traspatio (aves de corral y cerdos)

Para la recolección de las muestras se realizó un hisopado cloacal y rectal para las aves de corral y los cerdos respectivamente. Los hisopos fueron colocados en tubos de ensayo con agar nutriente (pico de flauta), las muestras se mantuvieron a una temperatura de 4°C, para el transporte hasta las instalaciones de la Universidad de las Américas.

3.4 Identificación fenotípica de *Escherichia coli* y otras Enterobacterias

Las muestras provenientes del medio semisólido para coliformes y del agar nutriente, se sembraron en el medio cromogénico ChroMagar™ COL-APSE mediante la técnica de estriado por agotamiento. Posteriormente, se incubaron a 37°C por 18 horas. Este medio permite la diferenciación cromogénica de bacterias Gram negativas resistentes a la colistina, por lo que el aspecto típico de colonias presumibles de *Escherichia coli* presentaron un color rosado oscuro

a rojizo mientras que otras Enterobacterias (coliformes) tuvieron un color azul metálico (CHROMagar, 2018).

Las colonias de aspecto rosado oscuro, presumiblemente *E. coli*, fueron sembradas en el Agar con Eosina y Azul de Metileno (EAM o EMB por sus siglas en inglés) (Becton Dickinson, 2013). Este agar permitió la confirmación de *E. coli*, puesto que esta especie al fermentar de forma óptima la lactosa se exhibe con colonias de un aspecto verde metálico brillante en el medio.

Todas las colonias de aspecto azul metálico (coliformes) fueron sembradas en agar MacConkey, que es un medio selectivo y diferencial para microorganismos Gram negativos fermentadores y no fermentadores de lactosa (Becton Dickinson, 2013). Para la identificación inicial de probables *K. pneumoniae* en este medio se observaron colonias grandes incoloras de consistencia mucóide, ya que esta especie presenta una cápsula de polisacáridos (Padilla Chumacero, 2013). Además, al no ser bacterias fermentadoras de lactosa no se produce un viraje de color del medio.

3.5 Identificación bioquímica de *Klebsiella pneumoniae*

Después de la identificación fenotípica de posibles *Klebsiella pneumoniae* en agar MacConkey se requirió su identificación bioquímica (confirmación) por medio de ensayos de fermentación de carbohidratos y utilización de aminoácidos (Terragno et al., 2007) entre los que se destacan: Citrato de Simmons (Becton Dickinson, 2015), Agar Triple Azúcar Hierro (TSI por sus siglas en inglés) (Becton Dickinson, 2003), Urea (Becton Dickinson, 2007), Sulfuro Indol para Movilidad (SIM) (Becton Dickinson, 2008), Rojo de metilo y Voges-Proskauer (RM/VP) (Becton Dickinson, 2006).

En la *Tabla 1* se detalla la interpretación de la batería de 6 pruebas bioquímicas positivas para *K. pneumoniae*.

3.5.1 Fundamento de la técnica

Citrato de Simmons, CIT: Medio usado para la diferenciación de bacterias Gram negativas, su principio se basa en la determinación de la capacidad de un microorganismo para usar el citrato de sodio como única fuente de carbono para su metabolismo y crecimiento (Koneman et al., 2008). Todo microorganismo capaz de metabolizar el citrato de sodio produce la enzima citrato permeasa, responsable de convertir el citrato en piruvato. Esta reacción permite la descomposición de sales de amonio en amoniaco, lo que incrementa la alcalinidad del medio. De esta forma, se produce un cambio en el pH (Simmons, 1926), lo que será revelado por el cambio de color del indicador de azul de bromotimol de color verde (neutro) a azul (alcalino) (Becton Dickinson, 2015).

Agar Triple Azúcar y Hierro, TSI: Medio diferencial para identificar microorganismos capaces de fermentar azúcares, producir ácido sulfhídrico (H_2S) y gas. Contiene tres carbohidratos (glucosa, sacarosa y lactosa) que al fermentarse producen ácidos que son detectados por el indicador de pH, rojo fenol. Debido a la producción de ácidos, cambia el pH y se produce el viraje de color rojo (medio sin inocular) a amarillo; por el contrario, si se produce la alcalinización de peptonas no hay cambios en el pH por lo que, el medio se mantiene rojo (Becton Dickinson, 2003).

Además, para la detección de ácido sulfhídrico (H_2S), que es incoloro se incluye el indicador tiosulfato de sodio (fuente de átomo de azufre) y las sales del medio (sulfato ferroso y citrato amónico férrico) que interactúan con el H_2S para producir sulfuro ferroso, precipitado negro insoluble. Existen 3 tipos de fermentación:

cuando un microorganismo es incapaz de fermentar glucosa, por lo tanto, hay ausencia de producción de ácido (K/K); fermentación de glucosa, más no de lactosa y sacarosa (K/A) y fermentación de glucosa y lactosa o sacarosa, característico de coliformes como *E. coli* y *K. pneumoniae* (A/A) (Koneman et al., 2008).

Urea Agar Base: Medio diferencial para la identificación de microorganismos de la familia Enterobacteriaceae, capaces de metabolizar la urea gracias a la enzima ureasa, para su crecimiento (Koneman et al., 2008). La urea es una diamida del ácido carbónico que puede ser hidrolizada con liberación de amoníaco y dióxido de carbono (Rustigian & Stuart, 1941).

Al momento de la incubación se libera amoníaco debido a la hidrolisis de la urea, esta reacción alcalina produce un cambio de color de rojo rosado (medio sin inocular) a fucsia rojizo debido al indicador de cambio de pH, rojo fenol (Becton Dickinson, 2007).

Sulfuro Indol Motilidad, SIM: Medio utilizado para la determinación de la producción de ácido sulfhídrico (H_2S), formación de indol y movilidad de microorganismos entéricos. El medio está compuesto por tiosulfato sódico y sulfato ferroso de amonio que son indicadores de la producción de H_2S . El sulfato ferroso de amonio reacciona con H_2S , para producir un precipitado negro (sulfuro ferroso). Además, el medio contiene peptona de caseína, la cual es rica en el aminoácido triptófano que es degradado por determinadas bacterias para producir indol, mediante las enzimas triptofanasas. Después de 24 horas de incubación del medio inoculado se puede detectar la producción de indol mediante la adición del reactivo de Kovacs (Becton Dickinson, 2008). El indol producido reacciona con *p*-dimetilaminobenzaldehído del reactivo de la prueba de indol para formar un compuesto quinoidal de color rojo violeta, que se observa por la formación de un anillo en la capa alcohólica superficial del medio (Becton

Dickinson, 2017). Para la detección de la motilidad bacteriana el medio es semisólido, por lo que al haber crecimiento hacia el exterior desde la línea central de inoculación se evidenciará una motilidad positiva para el microorganismo (Becton Dickinson, 2008).

Rojo de Metilo y Voges-Proskauer, RM/VP: Medio en el que se producen reacciones usadas para evidenciar compuestos generados por el metabolismo de glucosa, el piruvato es un punto medio dentro del metabolismo microbiano, ya que a partir de este la fermentación de la glucosa puede tomar varias vías como la fermentación del 2,3 butanodiol con productos finales como el acetil-metil-carbinol (acetoína) y la fermentación ácido mixta con productos finales ácidos como ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico (Laboratorios Britania, 2015).

La reacción de Voges-Proskauer (VP) sirve para la detección de diacetilo, formado por la oxidación de acetoína en presencia de oxígeno. Por tanto, se deben agregar reactivos como el α -naftol (intensificador de color) e hidróxido de potasio al 40% (contribuye a absorción de CO_2). El diacetilo se evidencia en el medio con un cambio de color a rojo (Laboratorios Britania, 2015).

El rojo de metilo (RM) es un indicador de pH entre 6 (amarillo) y 4,4 (coloración roja), es utilizado para observar la producción de ácidos mediante la fermentación ácido mixta (Becton Dickinson, 2006).

Tabla 1.

Interpretación de la batería de pruebas bioquímicas para la confirmación de *K. pneumoniae*.

PRUEBA	Citrato	TSI	Urea	SIM	RM	VP
	+	A/A	+	H ₂ S -	+	-
INTERPRETACIÓN		Gas + H ₂ S -		Movilidad - Indol -		

Nota: A/A: ácido/ácido, H₂S: ácido sulfhídrico

3.6 Criopreservación de *E. coli* y *K. pneumoniae* resistentes a colistina

Después de llegadas las muestras fecales a los laboratorios de la Universidad de las Américas, se sembraron en tubos con caldo BHI (5mL) para su enriquecimiento a 37°C por 18 horas. Posteriormente, se alicuotaron las bacterias enriquecidas en proporción 5:1 con glicerol, y fueron almacenadas en dos microtubos (1,5 mL) a -20°C y -80°C respectivamente, siguiendo lo establecido por el protocolo de preservación mejorada mediante la congelación con glicerol para bacterias de Hollander & Nell (1954).

En segundo lugar, después del cultivo y crecimiento de probables *E. coli* (colonias de color rosa oscuro) y otras Enterobacterias (colonias de aspecto azul metálico) en ChroMagar™ COL-APSE, se sembraron en BHI para su enriquecimiento a 37°C por 18 horas y se criopreservaron para su confirmación por medio de la siembra en el agar EMB y pruebas bioquímicas.

Finalmente, las bacterias *E. coli* y *K. pneumoniae* confirmadas se criopreservaron para los ensayos de la confirmación de sensibilidad a colistina con las condiciones antes mencionadas.

3.7 Confirmación de resistencia a colistina mediante el método de microdilución con caldo

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las enterobacterias de este estudio, se utilizó el método de microdilución en caldo , siguiendo las recomendaciones planteadas por el “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2018).

La colistina es utilizada para pruebas de susceptibilidad en Enterobacterias, junto con otros antimicrobianos, los valores de corte para este antimicrobiano fueron establecidos en base a lo que sugiere el CLSI (2018) dado por el resultado obtenido en la CMI siendo ≤ 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sensible y ≥ 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ resistente. Este procedimiento es utilizado para confirmar resistencia inusual en microorganismos cuando se obtiene un resultado limitante, o cuando los métodos de difusión en disco no son apropiados (Andrews, 2001). Debido al alto peso molecular y la naturaleza anfipática de la colistina se obstaculiza su difusión en el agar, dando como resultado zonas de inhibición pequeñas, por lo que la determinación de sensibilidad y resistencia se dificulta al momento de la medición del halo de inhibición (Malbrán, 2017). Es por esto, que los métodos de dilución son los más adecuados, ya que proporcionan datos exactos sobre la concentración utilizada para la determinación de un valor de corte y se puede evidenciar claramente la inhibición de crecimiento de los microorganismos (Balouiri, Sadiki, & Ibensouda, 2016).

3.7.1 Fundamento de la técnica

La concentración mínima inhibitoria (CMI) es considerada como la concentración de antibiótico más baja que inhibirá el crecimiento de un microorganismo después de 24 horas de incubación en condiciones propicias (Andrews, 2001).

La técnica de microdilución en caldo consiste en la preparación de diluciones del antimicrobiano a evaluar, estas diluciones preparadas deben ser sembradas en conjunto con un inóculo microbiano en una microplaca de 96 pocillos. Pasado el tiempo de incubación es necesario confirmar visualmente el crecimiento microbiano en la base de cada pocillo, por métodos de tinción o por espectrofotometría. De esta forma se puede determinar la CMI para cada uno de los microorganismos de interés (Balouiri et al., 2016).

3.7.2 Procedimiento

Los aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* fueron incubados en BHI por 18 horas a 37°C para su enriquecimiento. Después se sembraron en agar nutriente, mediante la técnica de estriado por agotamiento para obtener colonias aisladas, y se incubaron a 37°C por 18 horas. Las colonias provenientes del agar nutriente fueron cultivadas en el medio Mueller Hinton Broth hasta tener un inóculo de 0,5 en la escala de McFarland. Esto se logró mediante un turbidímetro (Spectroquant® Move 100) hasta obtener un inóculo de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

Esta suspensión fue sembrada con diluciones del antibiótico (2 µg/mL para sensible y 4 µg/mL para resistente) por triplicado en una microplaca de 96 pocillos. Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas. Se midió la turbidez en un lector de microplacas (*BioTek Synergy HT Microplate Reader*) para comprobar a que concentración se produce la inhibición del crecimiento de los microorganismos *E. coli* y *K. pneumoniae* (CLSI, 2018).

Como controles positivos para *E. coli* se usaron aislados portadores del gen *mcr-1*, donados por Yamamoto et al (2019). Se utilizaron las cepas *E. coli* ATCC 25922 y *K. pneumoniae* ATCC 33495 como controles negativos, para validar el método utilizado.

3.8 Extracción de ADN

Para iniciar con las pruebas moleculares se extrajo el ADN de todos los aislados confirmados como *K. pneumoniae* y *E. coli*, de los cuales se tomaron 6 colonias, y se siguió la metodología de extracción descrita por Suenaga & Nakamura y colaboradores (2005). El ADN extraído fue almacenado a -20°C. (Anexo 3).

3.9 Diseño y Selección de cebadores

El diseño de cebadores para el gen *mcr* y sus variantes se efectuó mediante el uso del paquete bioinformático Primer-BLAST, proporcionado por la plataforma NCBI, que integra un mecanismo de alineamiento global y detecta de forma sensible posibles objetivos de amplificación (Ye et al., 2012). Las secuencias de las variantes del gen *mcr* (*mcr-1* a *mcr-8*) fueron obtenidas de la base pública GeneBank®. Por lo tanto, Primer-BLAST simuló *in silico* el alineamiento de los cebadores en cadenas molde perteneciente a distintos organismos, para determinar la especificidad de los cebadores diseñados. De esta forma se seleccionaron los cebadores que demostraron una alta especificidad para las especies bacterianas de interés de este estudio.

3.10 Identificación molecular del gen *mcr* (*Mobile Colistin Resistance*)

3.10.1 Diseño de PCR múltiple

Se utilizó el kit QIAGEN *Multiplex* PCR que consta de un *buffer* para PCR-múltiple, *Multiplex* MM (polimerasa *HotStarTaq* DNA, MgCl₂, factor sintético MP),

Q-solution (Aditivo que facilita la amplificación del ADN de interés) y agua de PCR (Qiagen, 2010).

Mediante la técnica de PCR múltiple, y para efectos del proyecto se realizó la identificación del gen *mcr-1* con los cebadores *Forward*: (5'-GCTACTGATCACCACGCTGT-3') y *Reverse*: (5'-AGCTGAACATACACGGCACA-3') con un tamaño del producto de 698 pb, y del gen *mcr-4* con los cebadores *Forward*: (5'-GCGGGCAGACTATGATCCTC-3') y *Reverse*: (5'-TGAATATCACTGCGCGGACA-3') con un tamaño del producto de 351 pb. Estas dos variantes se seleccionaron puesto que hasta la fecha han sido las únicas descritas en Ecuador en investigaciones como las de Ortega-Paredes y colaboradores (2016) y Yamamoto et al (2019) para el gen *mcr-1* y *mcr-4* de datos aun no publicados.

Se usaron controles positivos que fueron donados por Yamamoto et al (2019) para los genes *mcr-1* al *mcr-5*. Además, se utilizaron las cepas *E. coli* ATCC 25922 y *K. pneumoniae* ATCC 33495 como controles negativos, para comprobar la especificidad de los amplicones.

3.10.2 Parámetros usados en la PCR múltiple

En las reacciones de PCR se realizó una mezcla de amplificación de 10 µL con una concentración de cada uno de los componentes de 1 µM de *multiplex* MM, 0.2 µM de la mezcla de los pares de cebadores para los genes *mcr-1* y *mcr-4*, y 1 µM de *Q-solution*, según lo recomendado por el manual del *kit* QIAGEN *Multiplex* PCR (Qiagen, 2010).

Las condiciones del ciclo de PCR se detallan en la *Tabla 2*.

Tabla 2.

Condiciones de los ciclos de PCR múltiple para la amplificación de los genes *mcr-1* y *mcr-4*.

CICLO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO
Activación inicial	95	15 min
Denaturación	94	30s
Annealing	62	90s
Extensión	72	90s
Extensión final	72	10 min

Nota: La PCR se realizó con un número de 30 ciclos.

3.10.3 Visualización en geles de agarosa

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2%, en TBE 1X, teñidos con *SyBR Safe*. Posteriormente, se observaron los resultados obtenidos en el transiluminador ChemiDoc.

3.11 Confirmación mediante secuenciación del gen *mcr*

Ciertos amplificadores positivos para el gen *mcr* fueron secuenciados con la técnica de secuenciación Sanger (*Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer*) para confirmar que se trate de la variante que la PCR-múltiple indica.

Para determinar la variante de interés se alinearon las secuencias obtenidas con otras ya descritas y caracterizadas en la base de datos GeneBank® mediante el uso del programa bioinformático Geneious 8.0 y Mega 7.

3.12 Análisis estadístico

Se realizó la estimación de intervalos de confianza para las prevalencias de los aislados obtenidos en de cada bacteria en estudio (*E. coli* y *K. pneumoniae*) por cada uno de los hospederos.

El mismo procedimiento se realizó para obtener los intervalos de confianza de las prevalencias del gen *mcr-1* *E. coli* y *K. pneumoniae*.

El análisis de los resultados se realizó en el programa informático RStudio, en el que se utilizó estadística paramétrica, para determinar si los datos obtenidos para el gen *mcr-1* en *E. coli* tienden a una distribución normal se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk.

Además, se aplicó la prueba de Levene para determinar la variabilidad de los genes *mcr-1* en las dos poblaciones de estudio.

Finalmente, se llevó a cabo la prueba “t de student para muestras independientes”, para determinar si existen diferencias significativas en las tasas de detección de los genes *mcr-1* en ambas regiones de estudio.

4. Capítulo IV. Resultados y Discusión

4.1 Prevalencia de *E. coli* en la totalidad del estudio (humanos, cerdos y aves de corral)

De las 438 muestras fecales, se obtuvieron 378 aislados bacterianos de *E. coli*, de los cuales 198 aislados corresponden a hospederos de Santo Domingo de los Tsáchilas y 180 aislados a Pastaza. Por lo tanto, la prevalencia de *E. coli* en la totalidad de hospederos fue del 86% (378/438) con un intervalo de confianza de $0,83 < 0,86 < 0,89$.

Estudios de resistencia a colistina en los mismos hospederos reportan prevalencias de *E. coli* de: 73,1% (Xiaojuan Wang et al., 2017); 97% (Hmede & Kassem, 2018), 83,3% (X. Zhang et al., 2019), 90% (Lai et al., 2018) y 100% (Lim et al., 2016; Perrin-Guyomard et al., 2016; Yamamoto et al., 2019).

Los resultados obtenidos en este y los otros estudios mencionados concuerdan ampliamente con la literatura ya que esta bacteria es una de las que más han colonizado a organismos vivos (Madigan et al., 2015; Murray et al., 2014).

4.1.1 Prevalencia de *E. coli* según hospedero

4.1.1.1 Prevalencia de *E. coli* en humanos

Con un intervalo de confianza del $0,79 < 0,85 < 0,91$, este estudio consigue detectar un 85% (116/137) de *E. coli* a partir de muestras fecales de humanos (*Figura 17*). Resultado que se asemeja al de un estudio previo realizado por

Berglund y colaboradores, en donde aislaron *E. coli* a partir de humanos con una prevalencia del 71%. Al contrario, Wang y colaboradores (2017) aislaron *E. coli* de muestras de humanos (sangre, vías respiratorias y urinarias), con un 60% de prevalencia.

Por otro lado, un estudio informó un 90% de *E. coli* en personas con bacteriemia (Lai et al., 2018). Este resultado elevado, se relaciona a que la bacteria está asociada a enfermedades incluidas la gastroenteritis, infecciones extraintestinales (infecciones de tracto urinario, meningitis, bacteriemia y sepsis) (Murray et al., 2014).

4.1.1.2 Prevalencia de *E. coli* en cerdos

De los 147 cerdos muestreados, 128 fueron portadores de *E. coli*, con una prevalencia del 87% (128/147) en un intervalo de confianza de $0,82 < 0,87 < 0,92$ (Figura 17). Los datos obtenidos se asemejan a varios estudios a nivel mundial. Un estudio realizado en 100 muestras fecales del mismo hospedero donde se obtuvo una prevalencia de la misma bacteria del 90% (Kieffer et al., 2017). Wang y colaboradores en el 2019 obtuvieron resultados similares al aislar *E. coli* con una tasa de 83,3%. Igualmente, Zhang y colaboradores (2019) aislaron el 100% de *E. coli* de muestras fecales de cerdos. De la misma forma, Duggett y su grupo de trabajo (2018) aislaron 349 heces de cerdos y aislaron *E. coli* en un 100%, en un periodo de 2 años.

La prevalencia de *E. coli* obtenida a partir de muestras de carnes de cerdos fue del 66% en un estudio de resistencia a colistina (Clemente et al., 2019), la cual es diferente de los resultados obtenidos en este y los otros estudios mencionados anteriormente, esto puede deberse al método de muestreo utilizado y el origen de las muestras (Yamamoto et al., 2019).

4.1.1.3 Prevalencia de *E. coli* en aves de corral

Para las aves de corral se obtuvo una prevalencia de 87% (134/154) de *E. coli* con un intervalo de confianza de $0,82 < 0,87 < 0,92$ (Figura 17). Lo que se asemeja al estudio de Moawad y colaboradores (2018) en el que obtuvieron una tasa de *E. coli* provenientes de aves de corral del 87,5%. En China, en granjas de pollos de engorde, de las 213 muestras se aisló el 100% de *E. coli* en un año, para lograr una muestra representativa (X. Zhang et al., 2019).

Por el contrario, Clemente y colaboradores (2019), aislaron 1206 *E. coli* de ciegos de varios animales, incluidas las aves de corral con una tasa de 32%, ya que en esta estructura del intestino estas bacterias no son tan abundantes.

Curiosamente, Eltai et al (2018) al analizar 172 muestras fecales solo de aves de corral, encuentran la presencia de *E. coli* en el 54% de las muestras; Wang y colaboradores (2017) por su parte, obtuvieron resultados similares. Para estos investigadores el 60% de los aislados procedentes de cloacas, presentaban esta bacteria, lo que difiere del presente estudio, y otros estudios, posiblemente por el método de muestreo (Yamamoto et al., 2019).

Es importante agregar que esta bacteria es uno de los microorganismos más representativos de la familia Enterobacteria (Wooley et al., 1994), y es un patógeno comensal del tracto gastrointestinal de aves jóvenes y adultas (Alkeskas et al., 2015).

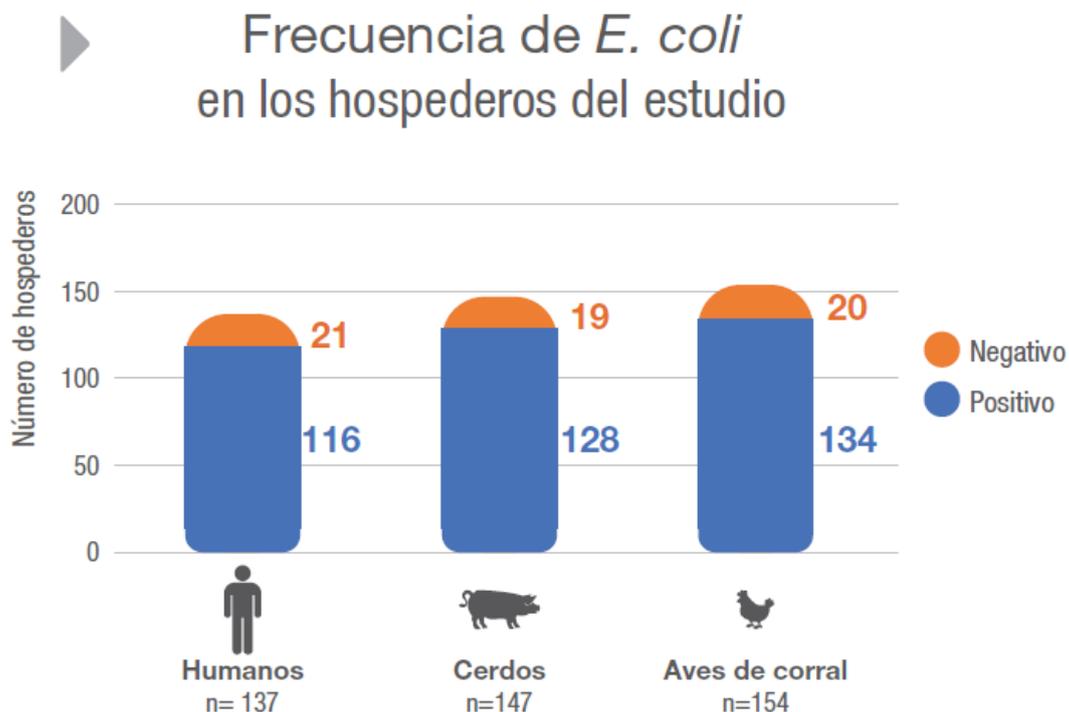


Figura 17. Frecuencia de *E. coli* en los hospederos (humanos, cerdos y aves de corral) de la población.

4.1.2 Prevalencia de *E. coli* según comunidades

4.1.2.1 Prevalencia de *E. coli* en Santo Domingo de los Tsáchilas

De los 226 hospederos muestreados en Santo Domingo de los Tsáchilas (72 humanos, 78 cerdos, 76 aves de corral), se obtuvieron 58 *E. coli* aisladas a partir de humanos, 74 de cerdos y 66 de aves de corral, con prevalencias en cada hospedero de 81% (58/72), 95% (74/78) y 87% (66/76), respectivamente (Figura 18).

► Prevalencia y distribución de *E. coli* con respecto a hospederos del estudio, en comunidades de Santo Domingo

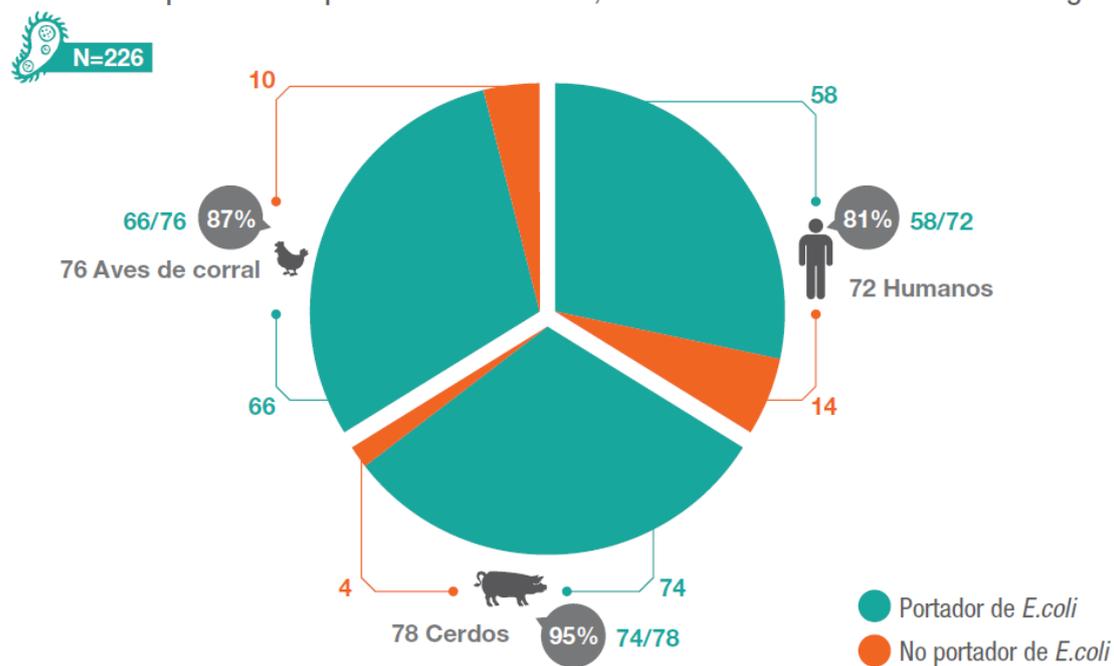


Figura 18. Prevalencia y distribución de *E. coli* con respecto a los hospederos del estudio, en comunidades de Santo Domingo.

4.1.2.2 Prevalencia de *E. coli* en Pastaza

En las comunidades rurales de Pastaza se muestrearon a 212 hospederos (65 humanos, 69 cerdos, 78 aves de corral) de los cuales se obtuvieron 58 *E. coli* aisladas a partir de humanos, 54 de cerdos y 68 de aves de corral con una prevalencia en cada individuo de 89% (58/65), 78% (54/69) y 87% (68/78), respectivamente como se muestra en la Figura 19.

► Prevalencia y distribución de *E. coli* con respecto a hospederos del estudio, en comunidades de Pastaza

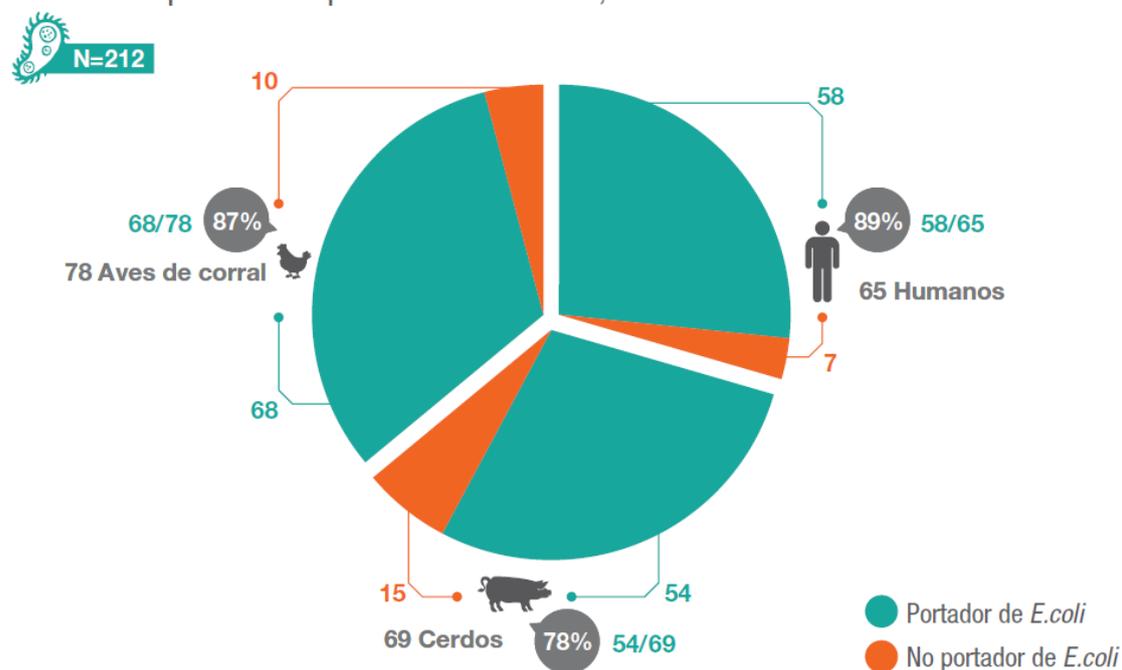


Figura 19. Frecuencia y distribución de *E. coli* con respecto a los hospederos del estudio, en comunidades de Pastaza.

En cuanto a la distribución de *E. coli* en las comunidades rurales de Ecuador, en Santo Domingo el hospedero principal de esta bacteria fue el humano con el 81% de prevalencia. Por otro lado, en Pastaza el cerdo fue el hospedero con mayor prevalencia del microorganismo.

4.2 Prevalencia de *K. pneumoniae* en la totalidad del estudio (humanos, cerdos y aves de corral)

De las 438 muestras fecales, se obtuvieron 164 aislados bacterianos de *K. pneumoniae*, de los cuales 97 aislados corresponden a hospederos de Santo Domingo de los Tsáchilas y 67 aislados a Pastaza. Por lo tanto, la prevalencia de *K. pneumoniae* en la población fue del 37% (164/438) con un intervalo de

confianza de $0,32 < 0,37 < 0,42$. Yang y colaboradores (2018) en el período de 2010 a 2015 colectaron 183 muestras, de las que se pudo aislar en un 100% *K. pneumoniae*. Cabe destacar que estos autores realizaron un esfuerzo en 5 años para colectar esta cantidad de analitos, y recorrieron 13 provincias y municipalidades chinas para lograrlo. El aislamiento del 100% de *K. pneumoniae* es bastante relevante, ya que esta bacteria es mucho más difícil de aislar que *E. coli* (Poirel et al., 2017). Resultados iguales se alcanzaron en la investigación de Xiaoming Wang y colaboradores (2018), en donde se obtuvieron prevalencias del 100% de la misma bacteria, de muestras provenientes de humanos.

4.2.1 Prevalencia de *K. pneumoniae* según hospedero

4.2.1.1 Prevalencia de *K. pneumoniae* en humanos

Se aisló un 72% (99/137) de *K. pneumoniae* de muestras fecales de humanos con un intervalo de confianza de $0,60 < 0,72 < 0,80$ (Figura 20). Prevalencias mayores fueron reportados por Hadjadj y su grupo de trabajo (2017), en donde se obtuvieron muestras de *K. pneumoniae* en diferentes países europeos con una prevalencia del 100%. Por lo tanto, se puede asumir que los humanos son un importante hospedero de esta bacteria, ya que ésta, forma parte del tracto gastrointestinal y es una de las principales productoras de infecciones con relevancia clínica (Murray et al., 2014).

Al contrario, la prevalencia de *K. pneumoniae* obtenida por Wang y colaboradores (2017) fue del 41% a pesar de que el tamaño muestral fue grande (2353 individuos); sin embargo, esta fue una tasa significativa para el estudio. Resultados similares se obtuvieron en la publicación de Zurfluh y colaboradores (2017), en donde se aisló esta bacteria de personas sanas, empleados de una compañía procesadora de alimentos. La prevalencia de la bacteria para el mencionado estudio fue de 30%.

Las notables diferencias en las prevalencias de esta bacteria en humanos puede deberse a varios factores: el tamaño de muestra, los tiempos de colección de muestras, factores socio económicos o zona geográfica, que pueden incidir en el aislamiento de esta bacteria (Lawley et al., 2019).

4.2.1.2 Prevalencia de *K. pneumoniae* en cerdos

En este estudio, de los 147 cerdos muestreados, 128 fueron portadores de *K. pneumoniae*, con una prevalencia del 15% (22/147) en un intervalo de confianza de $0,09 < 0,15 < 0,21$ (Figura 20). El mismo resultado, se obtuvo en el estudio de Kieffer, en donde se aisló el 15% de *K. pneumoniae* a partir hisopados rectales de cerdos (Kieffer et al., 2017).

4.2.1.3 Prevalencia de *K. pneumoniae* en aves de corral

Para las aves de corral se obtuvo una prevalencia de 28% (43/154) de *K. pneumoniae* aisladas a partir de muestras fecales con un intervalo de confianza de $0,21 < 0,28 < 0,35$ (Figura 20). Los mismos resultados fueron obtenidos por Wang y su grupo de trabajo en 2017 al haber aislado la misma bacteria en un 28%, lo que valida los resultados de este estudio. Resultados similares fueron informados por Wang y colaboradores (2017) al haber obtenido una tasa de *K. pneumoniae* del 30%.

Wang y colaboradores (2018) obtuvieron resultados diferentes, con una prevalencia de 8,4% para *K. pneumoniae* aisladas a partir de aves de corral sanas. Asimismo, en la investigación de Moawad y colaboradores (2018), la prevalencia de *K. pneumoniae* obtenidas de hisopados cloacales de aves de corral a partir de 576 muestras fue del 2,8%. De acuerdo a los investigadores,

de este estudio, *E. coli* tuvo una competencia celular más elevada, liderando la mayor prevalencia entre todas las bacterias encontradas.

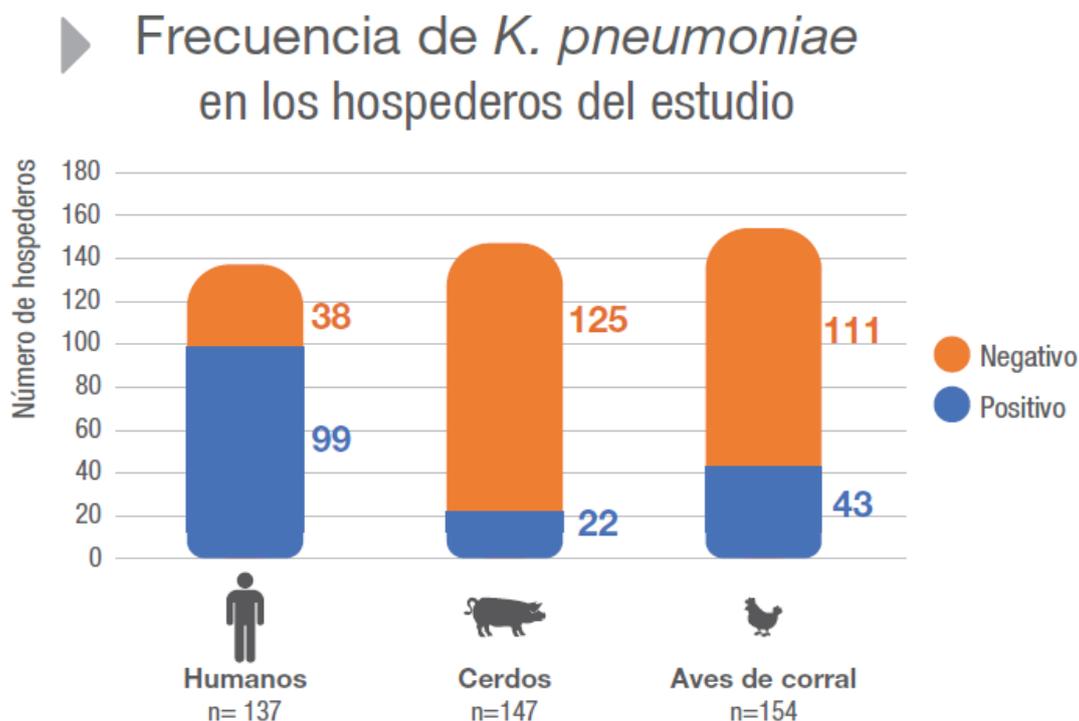


Figura 20. Distribución de *K. pneumoniae* en los hospederos (humanos, cerdos y aves de corral) de la población.

4.2.2 Prevalencia de *K. pneumoniae* según comunidades

4.2.2.1 Prevalencia de *K. pneumoniae* en Santo Domingo de los Tsáchilas

De los 226 hospederos muestreados en Santo Domingo de los Tsáchilas (72 humanos, 78 cerdos, 76 aves de corral), se obtuvieron 60 *K. pneumoniae* aisladas a partir de humanos, 17 de cerdos y 20 de aves de corral con prevalencias en cada hospedero de 83% (60/72), 22% (17/78) y 26% (20/76), respectivamente (Figura 21).

► Prevalencia y distribución de *K. pneumoniae* con respecto a hospederos del estudio, en comunidades de Santo Domingo

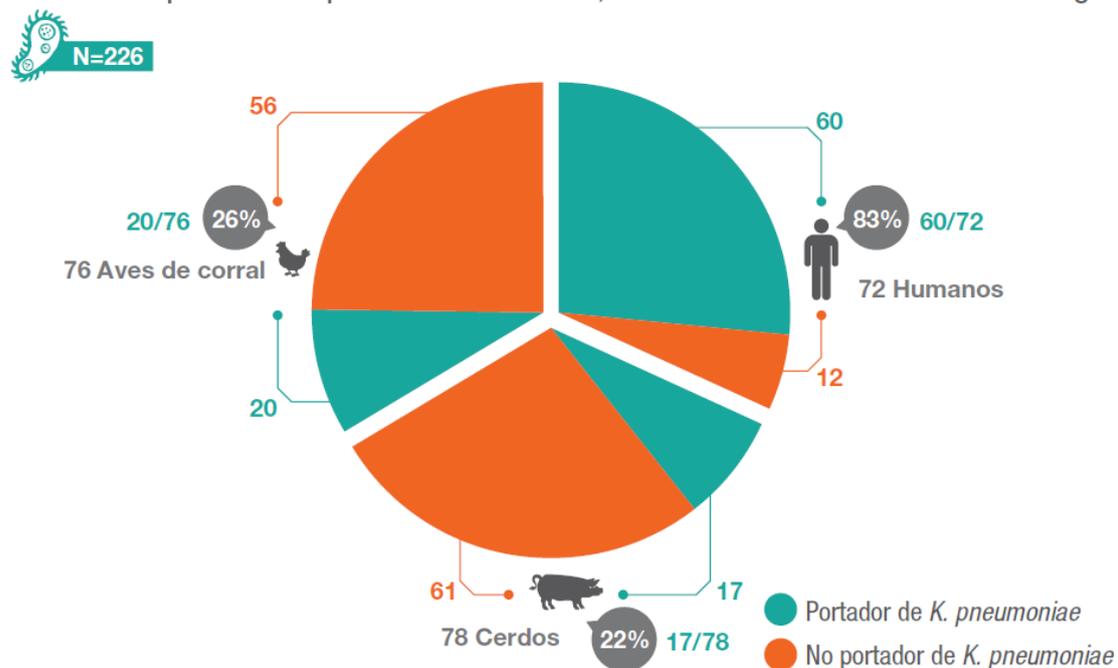


Figura 21. Frecuencia y distribución de *K. pneumoniae* con respecto a los hospederos del estudio, en comunidades de Santo Domingo.

4.2.2.2 Prevalencia de *K. pneumoniae* en Pastaza

En las comunidades rurales de Pastaza se muestrearon a 212 hospederos (65 humanos, 69 cerdos, 78 aves de corral) de los cuales se obtuvieron 39 *E. coli* aisladas a partir de humanos, 5 de cerdos y 23 de aves de corral con una prevalencia en cada individuo de 60% (39/65), 7% (5/69) y 29% (23/78), respectivamente como se muestra en la Figura 22.

► Prevalencia y distribución de *K. pneumoniae* con respecto a hospederos del estudio, en comunidades de Pastaza

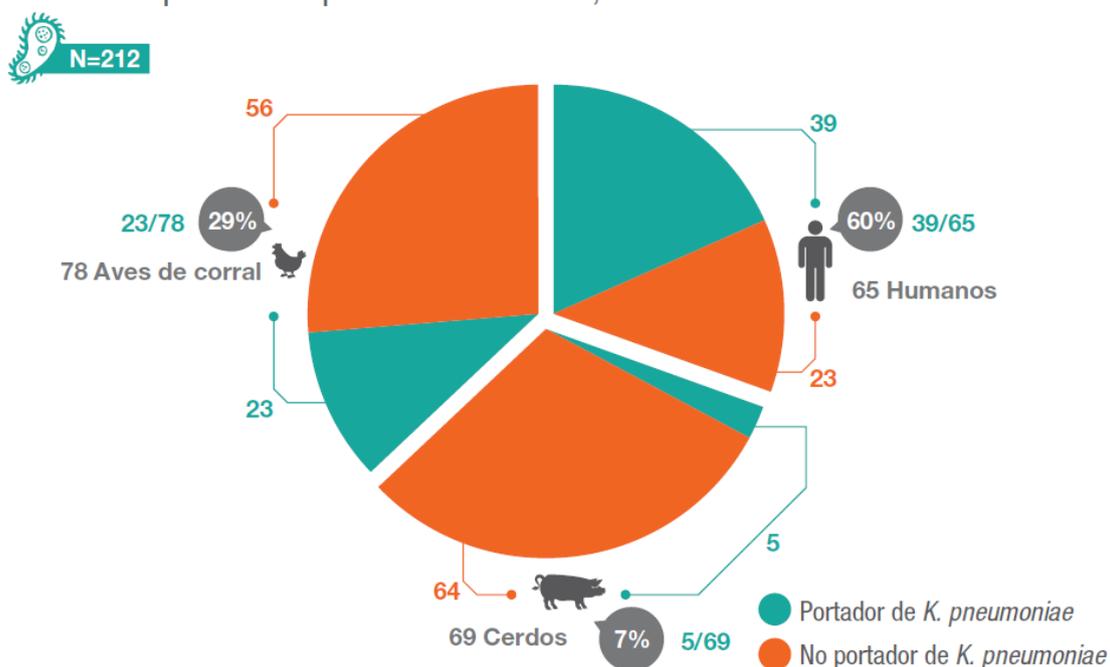


Figura 22. Frecuencia y distribución de *K. pneumoniae* con respecto a los hospederos del estudio, en comunidades de Santo Domingo.

En cuanto a la distribución de *K. pneumoniae* en las dos comunidades rurales estudiadas de Ecuador, el principal hospedero de esta bacteria fue el humano, seguido de los cerdos y las aves de corral.

4.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria por medio del método de microdilución en caldo

De los 542 aislados bacterianos (378 *E. coli* y 164 *K. pneumoniae*) obtenidos previamente en este estudio que se evaluó el perfil de resistencia a colistina. Los resultados indican que solo 4 (2 *E. coli* y 2 *K. pneumoniae*) aislados fueron resistentes al antibiótico de interés, en base a los puntos de corte (≤ 2 $\mu\text{g/mL}$ sensible y ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$ resistente) recomendados por el CLSI (2018). Se obtuvo

una prevalencia de 0,74% (4/542) de las bacterias del estudio (*E. coli* y *K. pneumoniae*) resistentes a colistina entorno al número muestral total. Este no es el primer estudio que reporta resultados con prevalencias bajas de resistencia a colistina por medio de la microdilución en caldo, tal como se evidencia en los estudios de Clemente et al., (2019), Lim et al., (2016); Moawad et al., 2018; Rapoport et al., 2016).

4.3.1 Resistencia fenotípica de *E. coli* a colistina

Según el ensayo de microdilución en caldo, se obtuvieron tan solo dos aislados de *E. coli* resistentes provenientes de Santo Domingo de los Tsáchilas (2/198) y ningún aislado resistente de Pastaza (0/180) (Tabla 3).

Los aislados resistentes se encontraron en muestras de cerdos y presentaron crecimiento sobre el punto de corte de 4µg/mL sugerido por el CLSI (2018). Por su parte, los 58 aislados de humanos y los 66 aislados de aves de corral resultaron susceptibles a la colistina.

Tabla 3.

E. coli resistentes a colistina en base al método de microdilución en caldo según puntos de corte del CLSI (2018).

ZONA	<i>E. coli</i>	# bacterias resistentes
Santo Domingo de los Tsáchilas	198	2
Pastaza	180	0

Nota: De las 378 *E. coli* aisladas, 2 presentaron crecimiento a 4µg/mL.

La prevalencia total de *E. coli* resistentes a colistina por este método fue del 0,53% (2/378). En Corea del Sur, Lim y colaboradores (2016) detectaron *E. coli* resistente a colistina mediante pruebas de susceptibilidad y se informó que solo el 1,46% de los aislados de *E. coli* fueron resistentes a colistina por medio de los ensayos de microdilución en caldo. Esto corrobora los resultados obtenidos en esta investigación. Se destaca que tanto en el presente estudio como en el realizado por Lim y colaboradores (2016), se siguieron los parámetros establecidos por el CLSI y el EUCAST. Rapoport y colaboradores (2016) obtuvieron resultados similares, en sus aislados de *E. coli* en los que, la resistencia a colistina en cepas obtenidas de humanos, aumentó del 0,4% en 2012 al 0,8% en 2014. En el estudio de Clemente y colaboradores (2019) de las 1206 *E. coli* aisladas, reportan haber obtenido una reducida resistencia a la colistina en un 8,6% entre ganado porcino y aves de corral, en contraste con nuestra investigación y la de Rapoport et al (2016) la resistencia obtenida por estos investigadores es relevante.

El porcentaje de *E. coli* susceptibles hacia la colistina de este estudio fue del 99,41%. Resultado distinto que el informado por R. Wang y colaboradores en 2018 donde obtuvieron un 61,1% de *E. coli* susceptibles a colistina. En el estudio de Moawad y su grupo de trabajo (2018) se obtuvo solo 1 aislado fenotípicamente resistente a colistina de los 67 aislados de esta bacteria, por lo tanto, el porcentaje de susceptibilidad fue del 98,41%, resultado que es similar al obtenido en este estudio. Del mismo modo, Wang y colaboradores (2018) obtuvieron un 96,6% de *E. coli* susceptibles en estas pruebas.

Clemente y colaboradores (2019) realizaron diluciones seriadas de 4, 8, 16, 32 µg/mL, para determinar la MIC, la misma metodología realizaron otros autores (Hadjadj et al., 2017; Kieffer et al., 2017; Moawad et al., 2018) ya que se ha sugerido que los puntos de corte propuestos por el CLSI (2018) y el EUCAST (2020) deben ser reevaluados (Malbrán, 2017).

4.3.2 Resistencia fenotípica de *K. pneumoniae* a colistina

Según el ensayo de microdilución en caldo, se obtuvieron tan solo dos aislados de *E. coli* resistentes provenientes de Pastaza (2/67) y ningún aislado resistente de Santo Domingo de los Tsáchilas (0/180) (Tabla 4).

Los aislados resistentes fueron aislados de cerdos y presentaron crecimiento sobre el punto de corte de 4µg/mL sugerido por el CLSI (2018). Los 39 aislados de humanos y los 23 aislados de aves de corral resultaron susceptibles a la colistina.

Tabla 4.

K. pneumoniae resistentes a colistina en base al método de microdilución en caldo

ZONA	<i>K. pneumoniae</i>	# bacterias resistentes
Santo Domingo de los Tsáchilas	97	0
Pastaza	67	2

Nota: De las 164 *K. pneumoniae* aisladas, 2 presentaron crecimiento a 4µg/mL.

La prevalencia de *K. pneumoniae* resistentes a colistina por este método fue del 1,2% (2/164). En otro estudio, las tasas de resistencia a la colistina de aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* fueron de 0,6% (Xiaojuan Wang et al., 2017). En la caracterización clínica de pacientes con bacteriemia se detectó de los 140 aislados (entre *E. coli* y *K. pneumoniae*) un 2,38% eran de *K. pneumoniae* resistente a colistina por medio de micro dilución con caldo.

El porcentaje de *K. pneumoniae* susceptibles a la colistina de este estudio fue del 98,8%. Resultados similares se reportaron en un estudio anterior, en donde

el porcentaje de susceptibilidad fue del 96% y el 4% restante correspondió a *K. pneumoniae* visiblemente resistentes a colistina; pero estas no fueron portadoras del gen *mcr-1*. Al contrario, Wang y colaboradores (2018) informaron una prevalencia menor para esta bacteria (69,2%) que fueron susceptibles a la colistina.

4.4 Diseño de cebadores para los genes *mcr-1* al *mcr-8*

Los cebadores diseñados para cada uno de los genes se detallan en la *Tabla 5*, cada uno con su tamaño del producto correspondiente.

Tabla 5.

Cebadores diseñados en el programa bioinformático PRIMER-BLAST para los genes *mcr* (*mcr-1* al *mcr-8*).

Gen	Cebador Forward	Cebador Reverse	Tamaño
<i>mcr-1</i>	GCTACTGATCACCACGCTGT	AGCTGAACATACACGGCACA	698 pb
<i>mcr-2</i>	GTGTCAGCCTTGTGCTGTTG	AGCGGTCAAGCGTATCTAGC	471 pb
<i>mcr-3</i>	GGGATAAGCTGGTTGGCTT	AACAGATGATTGGGGCCTG	563 pb
<i>mcr-4</i>	GCGGGCAGACTATGATCCTC	TGAATATCACTGCGCGGACA	351 pb
<i>mcr-5</i>	TACGTCATCTCGGGCATTCTG	CCTTTACAGCCCGACTGGTT	404 pb
<i>mcr-6</i>	CATAGTCCTTGGTACCGCCG	TGGTGTCAATAACGGTGCCA	295 pb
<i>mcr-7</i>	AGGCGACCTCCTACCTGAAT	ATGGAGACCCCGCTTCTTTG	613 pb
<i>mcr-8</i>	AATGCTCCACCGAAACTGGT	GCGAGAACATGCAGGGTAGT	184 pb

Para el diseño de cada uno de los pares de cebadores se tomó en cuenta parámetros como especificidad, porcentaje de G/C, temperatura de *Melting* (T_m), dímeros de cebadores y *hairpins*.

4.5 Determinación genotípica de la resistencia a colistina de genes *mcr-1* y *mcr-4* mediante PCR múltiple

Se obtuvieron 340 *E. coli* y 32 *K. pneumoniae* portadoras del gen *mcr-1*. Ningún aislado bacteriano fue portador del gen *mcr-4*.

4.5.1 PCR múltiple para genes *mcr-1* y *mcr-4* en *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*

En las Figuras 23 y 24 se muestran los resultados de la PCR múltiple a partir de muestras de ADN de *E. coli* y *K. pneumoniae*.

Se puede observar que la PCR múltiple es específica para el gen *mcr-1*. Se utilizó una escalera de pesos moleculares de 100-2000 pb (*ThermoFisher Scientific*).

Los controles positivos fueron obtenidos por donación del grupo de Yamamoto (en el año 2019), el fragmento de 698 pb corresponde a *mcr-1*, mientras que el fragmento de 351 pb corresponde al gen *mcr-4*.

Se utilizaron las cepas *E. coli* ATCC 25922 y *K. pneumoniae* ATCC 33495 como controles negativos, para comprobar la especificidad de los amplicones.

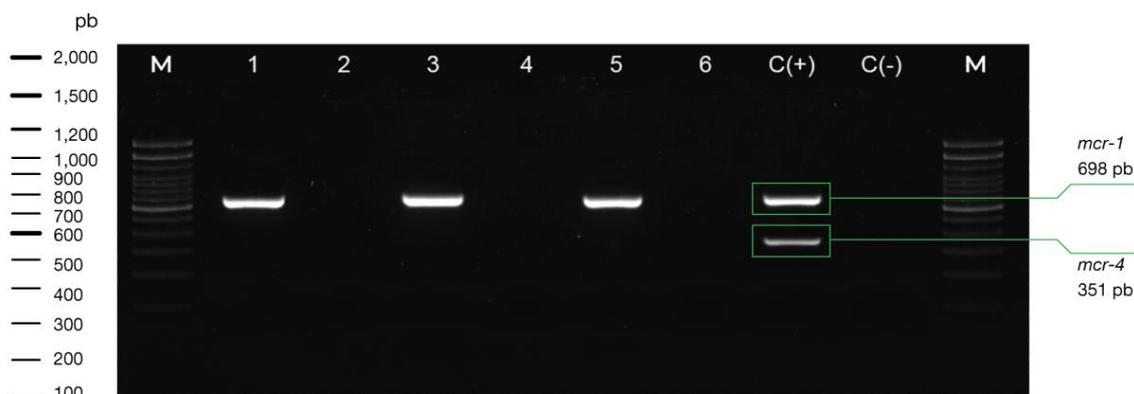


Figura 23. Productos de la PCR múltiple a partir de muestras de ADN de *E. coli*. M: Ladder; 1: presencia del gen *mcr-1* en humanos; 2: ausencia del gen *mcr-1* en humanos; 3: presencia del gen *mcr-1* en cerdos; 4: ausencia del gen *mcr-1* en cerdos; 5: presencia del gen *mcr-1* en aves de corral; 6: ausencia del gen *mcr-1* en aves de corral; C (+): *mcr-1* (698 pb) y *mcr-4* (351pb); C (-): *E. coli* ATCC 25922

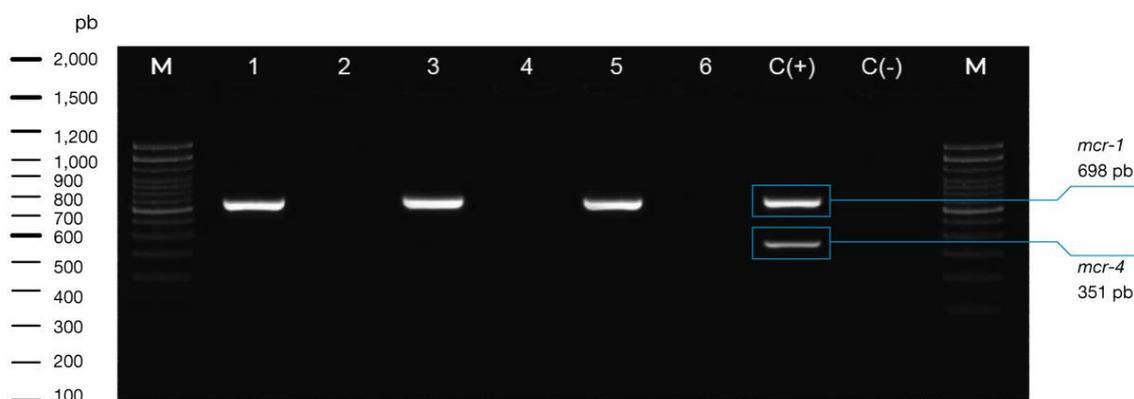


Figura 24. Productos de la PCR múltiple a partir de muestras de ADN de *K. pneumoniae*. M: Ladder; 1: presencia del gen *mcr-1* en humanos; 2: ausencia del gen *mcr-1* en humanos; 3: presencia del gen *mcr-1* en cerdos; 4: ausencia del gen *mcr-1* en cerdos; 5: presencia del gen *mcr-1* en aves de corral; 6: ausencia del gen *mcr-1* en aves de corral; C (+): *mcr-1* (698 pb) y *mcr-4* (351pb); C (-): *K. pneumoniae* ATCC 33495

4.6 Prevalencia del gen *mcr-1* en *E. coli* en la totalidad del estudio (humanos, cerdos y aves de corral)

4.6.1 Prevalencia de *E. coli* portadoras de *mcr-1* según hospedero

Los 378 aislados bacterianos de *E. coli* fueron sometidos a pruebas moleculares, y se obtuvieron 340 *E. coli* portadoras del gen *mcr-1*, con una prevalencia del 90% (340/378) con un intervalo de confianza de $0,87 < 0,90 < 0,93$. Elbediwi et al (2019) informaron en su revisión sistemática global que el gen *mcr-1* es la variante con mayor diseminación global. *mcr-1* lidera con una tasa del 95% sobre las 8 variantes reportadas (*mcr-2* a *mcr-9*). De la misma forma, Mendes Oliveira y colaboradores (2019) en su revisión sistemática reportaron que el gen *mcr-1* es el más común en América Latina y el Caribe, y de hecho el país con mayor tasa de este gen es Brasil con un 44,7%. Con respecto a otros continentes del mundo América Latina posee una tasa de genes *mcr* del 2,9%. Cabe destacar que en ambas investigaciones la mayoría de microorganismos portadores del gen *mcr* fueron obtenidos a partir de muestras de animales (cerdos, bovinos, aves de corral, entre otros).

4.6.1.1 Prevalencia de *E. coli* portadoras de *mcr-1* en humanos

Se aisló un 96% (111/116), de *E. coli* portadoras del gen *mcr-1* con un intervalo de confianza de $0,92 < 0,96 < 1,00$ (Figura 25). Resultados que se asemejan a los de un estudio realizado en Taiwán, en el que se obtuvo una prevalencia de *E. coli* portadoras del gen *mcr-1* del 75% en humanos (Lai et al., 2018). Resultados distintos se informaron por Berglund y colaboradores (2018) sobre la presencia del gen *mcr-1* en *E. coli* en un 25%. Igualmente, Rapoport y colaboradores (2016) obtuvieron una prevalencia cercana a la de Berglund, reportando un 32% de *E. coli* portadoras del gen *mcr-1* en humanos (aislados clínicos).

4.6.1.2 Prevalencia de *E. coli* portadoras de *mcr-1* en cerdos

En este estudio, de los 128 cerdos portadores de *E. coli*, 106 fueron portadores del gen *mcr-1*, con una prevalencia del 83% (106/128) con un intervalo de confianza de $0,76 < 0,83 < 0,90$ (Figura 25). Del mismo modo, en un estudio se obtuvo en *E. coli* un 79,2% de genes *mcr-1* provenientes de cerdos (Zhang et al., 2018). Otros resultados similares son los de Lai y colaboradores (2018) que obtuvieron una tasa del 87,5% de genes *mcr-1* presentes en *E. coli*. Por el contrario, en un estudio realizado entre 2010-2015, se reveló que el 10,6% de *E. coli* provenientes de cerdos fueron portadoras del gen *mcr-1* pero existió una mayor prevalencia (45%) de bacterias portadoras de genes BLEE y *mcr-1* (Clemente et al., 2019), lo cual es aún más preocupante ya que no solo son resistentes a colistina sino también a todos los β -lactámicos.

4.6.1.3 Prevalencia de *E. coli* portadoras de *mcr-1* en aves de corral

Para las aves de corral se obtuvo una prevalencia de 92% (123/134) de *E. coli* portadoras del gen *mcr-1* con un intervalo de confianza de $0,87 < 0,92 < 0,97$ (Figura 25). Zhang et al (2018) obtuvieron datos distintos a los de este estudio, e informaron una tasa de prevalencia de bacterias que albergan *mcr-1* en un 31,8%, es destacable mencionar que las prevalencias obtenidas en ese estudio proceden de muestras obtenidas en 25 municipalidades de China y, esos resultados fueron considerablemente mayores que los de otros estudios previamente realizados.

► Frecuencia del gen *mcr-1* en *E. coli* provenientes de los hospederos del estudio

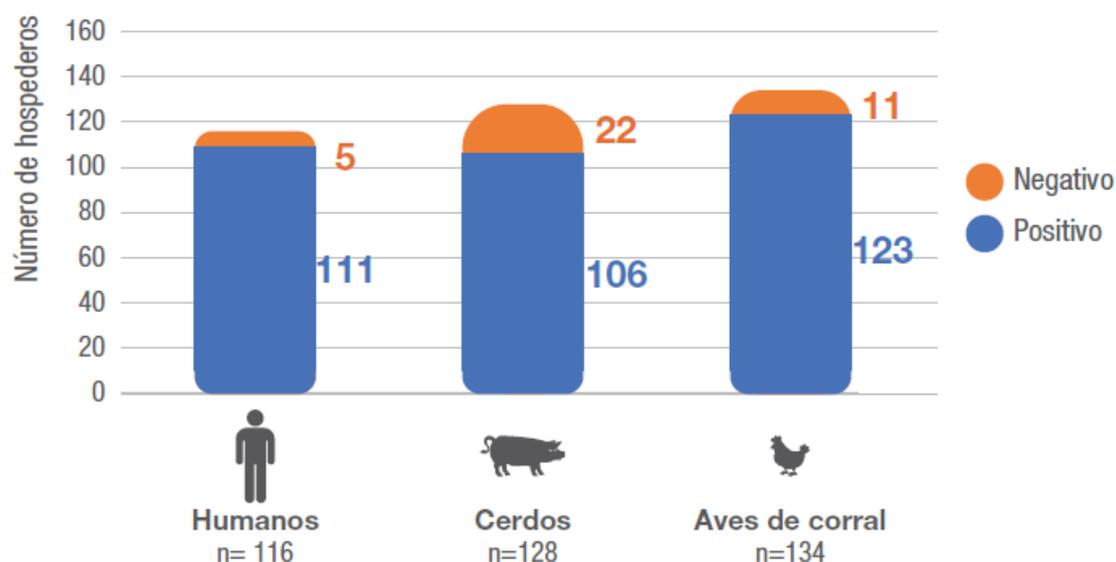


Figura 25. Frecuencia del gen *mcr-1* en hospederos (humanos, cerdos y aves de corral) portadores de *E. coli*.

4.6.2 Prevalencia de *E. coli* portadoras de *mcr-1* según comunidades

4.6.2.1 Prevalencia en la comunidad La Reforma (Santo Domingo de los Tsáchilas)

De las 198 *E. coli* provenientes de hospederos de Santo Domingo de los Tsáchilas, se obtuvieron 58 *E. coli* portadoras del gen *mcr-1* aisladas a partir de humanos, 69 de cerdos y 64 de aves de corral con prevalencias en cada hospedero de 100% (58/58), 93% (69/74) y 97% (64/66), respectivamente (Figura 26). Yamamoto y colaboradores (2019), en base a 66 muestras (cerdos y aves de corral) obtuvieron en esta provincia 51,4% de *E. coli* resistentes a colistina (portadores del gen *mcr-1*).

► Prevalencia y distribución del gen *mcr-1* en *E. coli* con respecto a hospederos del estudio, en comunidades de Santo Domingo

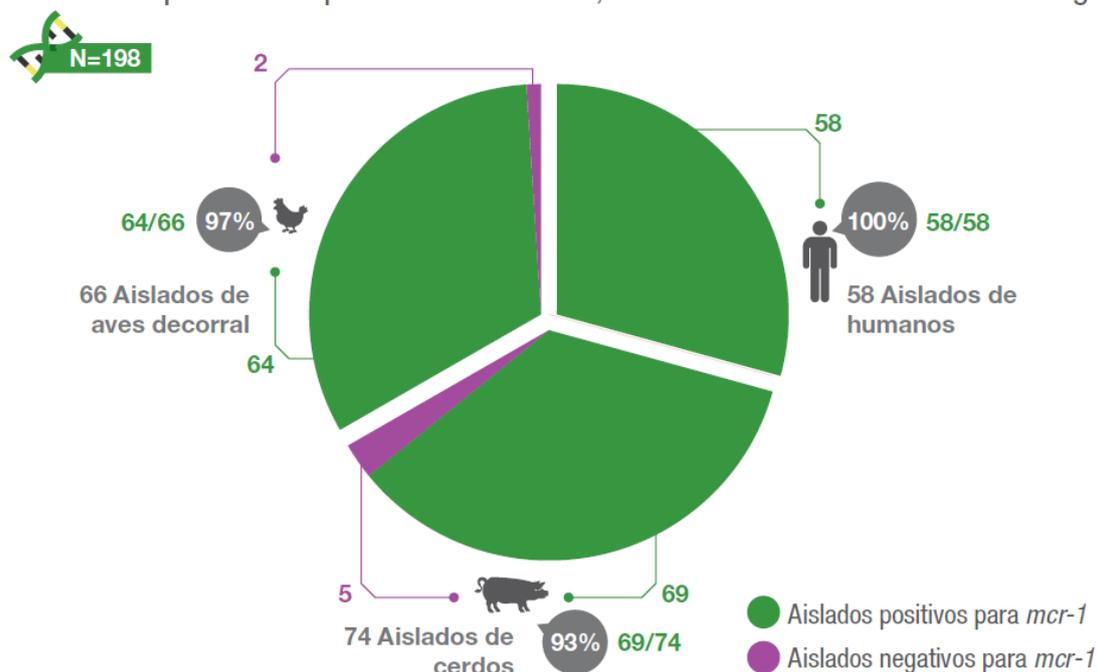


Figura 26. Frecuencia y distribución de *E. coli* portadoras del gen *mcr-1* con respecto a los hospederos del estudio, en comunidades de Santo Domingo.

4.6.2.2 Prevalencia en las comunidades San José y Samasunchi (Pastaza)

De las 180 *E. coli* provenientes de hospederos de Pastaza, se obtuvieron 53 *E. coli* portadoras del gen *mcr-1* aisladas a partir de humanos, 37 de cerdos y 59 de aves de corral con prevalencias en cada hospedero de 91% (53/58), 69% (37/54) y 87% (59/68), respectivamente (Figura 27). En esta provincia Yamamoto y colaboradores (2019) informaron una prevalencia de 41,9% que para este estudio corresponde al 85% en base a los resultados obtenidos, lo que representa el doble de lo obtenido por Yamamoto en Febrero de 2019. Esto demuestra la rápida diseminación del gen *mcr-1* en cepas de *E. coli* en el país.

► Prevalencia y distribución del gen *mcr-1* en *E. coli* con respecto a hospederos del estudio, en comunidades de Pastaza

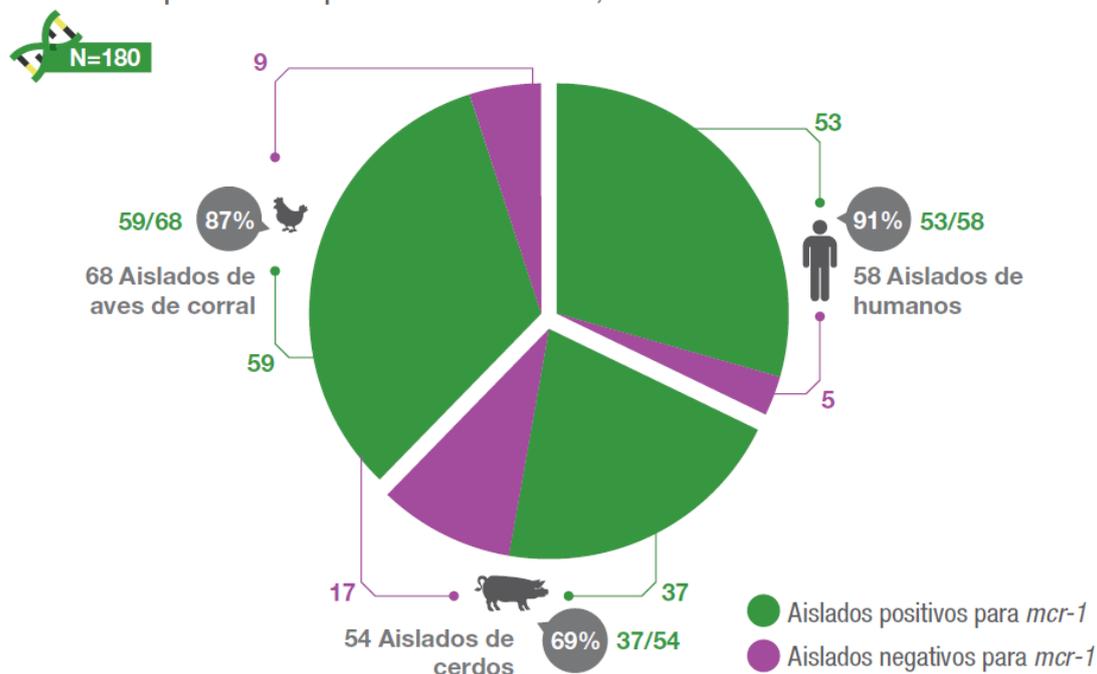


Figura 27. Frecuencia y distribución de *E. coli* portadoras del gen *mcr-1* con respecto a los hospederos del estudio, en comunidades de Pastaza.

Cabe recalcar que en ambas comunidades el principal hospedero de *E. coli* portadoras del gen *mcr-1* fue el humano.

4.7 Prevalencia del gen *mcr-1* en *K. pneumoniae* en la totalidad del estudio (humanos, cerdos y aves de corral)

4.7.1 Prevalencia de *K. pneumoniae* portadoras de *mcr-1* según hospedero

En este estudio, los 164 aislados bacterianos de *K. pneumoniae* (99 humanos, 22 cerdos, 43 aves de corral) fueron sometidos a pruebas moleculares, y se

obtuvieron 32 *K. pneumoniae* portadoras del gen *mcr-1*, responsable de la resistencia a colistina, con una prevalencia del 20% (32/164) con un intervalo de confianza de $0,14 < 0,20 < 0,26$.

Con respecto al número muestral total (438), se obtuvo un 7,3% (32/438) de *K. pneumoniae* portadoras del gen *mcr-1*. Resultados similares se informaron en un estudio en el que se descubrió la primera variante *mcr-7.1*, en donde se obtuvieron también *K. pneumoniae* portadoras del gen *mcr-1*, con una prevalencia del 5,5% con respecto al número muestral total (Yang et al., 2018).

4.7.1.1 Prevalencia de *K. pneumoniae* portadoras de *mcr-1* en humanos

Se aisló un 21% (21/99), de *K. pneumoniae* portadoras del gen *mcr-1* con un intervalo de confianza de $0,13 < 0,21 < 0,29$ (Figura 28). En otro estudio, se aislaron 7 *K. pneumoniae* a partir de muestras de humanos, obtenidas de países como Laos, Tailandia, Francia y Algeria. De las 7 *K. pneumoniae* obtenidas, 4 fueron portadoras del gen *mcr-1*, lo que corresponde a una prevalencia de 57% (Hadjadj et al., 2017). Resultados distintos reportan Lai y colaboradores (2018), quienes aislaron 673 *K. pneumoniae* y solo dos fueron portadoras de *mcr-1* con una tasa de 0,30%. Del mismo modo, en un estudio se obtuvo 1 *K. pneumoniae* portadora del gen *mcr-1* con una prevalencia muy cercana al cero (Zurfluh et al., 2017).

4.7.1.2 Prevalencia de *K. pneumoniae* portadoras de *mcr-1* en cerdos

En este estudio, de los 22 cerdos portadores de *K. pneumoniae*, 4 fueron portadores del gen *mcr-1*, con una prevalencia del 18% (4/22) con un intervalo de confianza de $0,02 < 0,18 < 0,34$ (Figura 28). Existe solo un estudio con el que se pueden discutir los resultados obtenidos en cerdos. El estudio fue realizado

por Kieffer y colaboradores (2017), quienes tuvieron resultados similares a los de este estudio en muestras de cerdos; de las 8 bacterias aisladas identificaron 1 *K. pneumoniae* portadora del gen *mcr-1* con una prevalencia de 12,5%, lo cual es notable teniendo en cuenta la recuperación infrecuente de *K. pneumoniae* en cerdos.

4.7.1.3 Prevalencia de *K. pneumoniae* portadoras de *mcr-1* en aves de corral

Para las aves de corral se obtuvo una prevalencia de 16% (7/43) de *K. pneumoniae* portadoras del gen *mcr-1* con un intervalo de confianza de $0,05 < 0,16 < 0,27$ (Figura 28). Los resultados obtenidos por Wang y su grupo de trabajo en 2017 son mayores que los obtenidos en este estudio, ya que encontraron el 46% (17/37) de *K. pneumoniae* portadoras del gen *mcr-1* en aves de corral. Diferentes resultados se informaron por Wang y colaboradores (2018), en donde solo el 3.7% de *K. pneumoniae* en el estudio de fueron portadoras del gen *mcr-1* (R. Wang et al., 2018).

El número de estudios y las tasas de *K. pneumoniae* positivas para *mcr-1* son más escasos, y notablemente menores que las de *E. coli*, de hecho, la mayoría de estudios epidemiológicos informan que, en general, los aislamientos positivos para *mcr-1* son provenientes de *E. coli* (Poirel et al., 2017). Esta aseveración también se ve sustentada en las dos revisiones sistemáticas que comprueban que el gen *mcr-1* está presente mayoritariamente en aislados de *E. coli* (Elbediwi et al., 2019; Mendes Oliveira et al., 2019). Autores como Kieffer y colaboradores (2017) hacen énfasis en que la recuperación de *K. pneumoniae* es importante, tomando en cuenta en que su recuperación es menos frecuente en animales.

A pesar de lo expuesto anteriormente, la resistencia a colistina en *K. pneumoniae* es un problema creciente de salud pública, ya que esta especie bacteriana es

uno de los principales patógenos causantes de infecciones nosocomiales y posee una gama amplia de mecanismos de resistencia a diversos antibióticos de amplio espectro (Walkty et al., 2009). La aparición de resistencia a colistina se ha reportado en varios estudios (A. C. Gales et al., 2012; Sutherland & Nicolau, 2015; Walkty et al., 2009), muchos de estos informan un incremento en las tasas de resistencia a colistina y otros fármacos (Sutherland & Nicolau, 2015). Incluso, es aún más preocupante el informe de múltiples brotes con *K. pneumoniae* resistentes a carbapenemas y colistina en América del Norte (Bogdanovich et al., 2011) y Europa (Giani et al., 2018).

► Frecuencia del gen *mcr-1* en *K. pneumoniae* provenientes de los hospederos del estudio

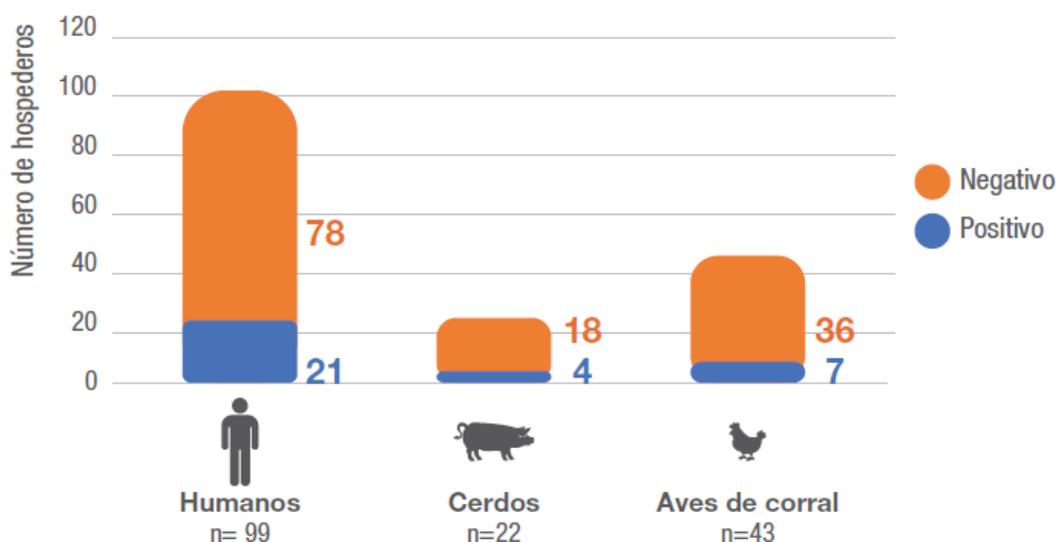


Figura 28. Distribución del gen *mcr-1* en hospederos (humanos, cerdos y aves de corral) portadores de *K. pneumoniae*.

4.7.2 Prevalencia de *K. pneumoniae* portadoras de *mcr-1* según comunidades

4.7.2.1 Prevalencia en la comunidad La Reforma (Santo Domingo de los Tsáchilas)

De las 97 *K. pneumoniae* provenientes de hospederos de Santo Domingo de los Tsáchilas, se obtuvieron 11 *E. coli* portadoras del gen *mcr-1* aisladas a partir de humanos, 4 de cerdos y 4 de aves de corral con frecuencias en cada hospedero de 18% (11/60), 24% (4/17) y 20% (4/20), respectivamente (Figura 29).

► Prevalencia y distribución del gen *mcr-1* en *K. pneumoniae* con respecto a hospederos del estudio, en comunidades de Santo Domingo

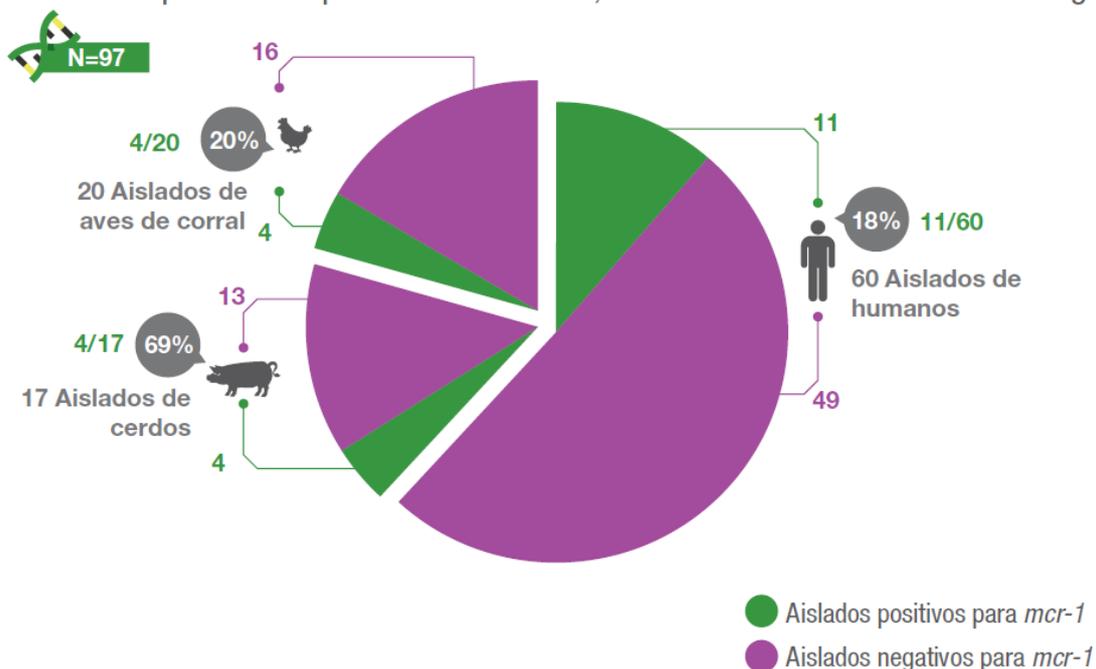


Figura 29. Frecuencia y distribución de *K. pneumoniae* portadoras del gen *mcr-1* con respecto a los hospederos del estudio, en comunidades de Santo Domingo.

4.7.2.2 Prevalencia en las comunidades San José y Samasunchi (Pastaza)

De las 67 *K. pneumoniae* provenientes de hospederos de Pastaza, se obtuvieron 10 *E. coli* portadoras del gen *mcr-1* aisladas a partir de humanos, 0 de cerdos y 3 de aves de corral con prevalencias en cada hospedero de 26% (10/39), 0% (0/5) y 13% (3/23), respectivamente (Figura 30).

► Prevalencia y distribución del gen *mcr-1* en *K. pneumoniae* con respecto a hospederos del estudio, en comunidades de Pastaza

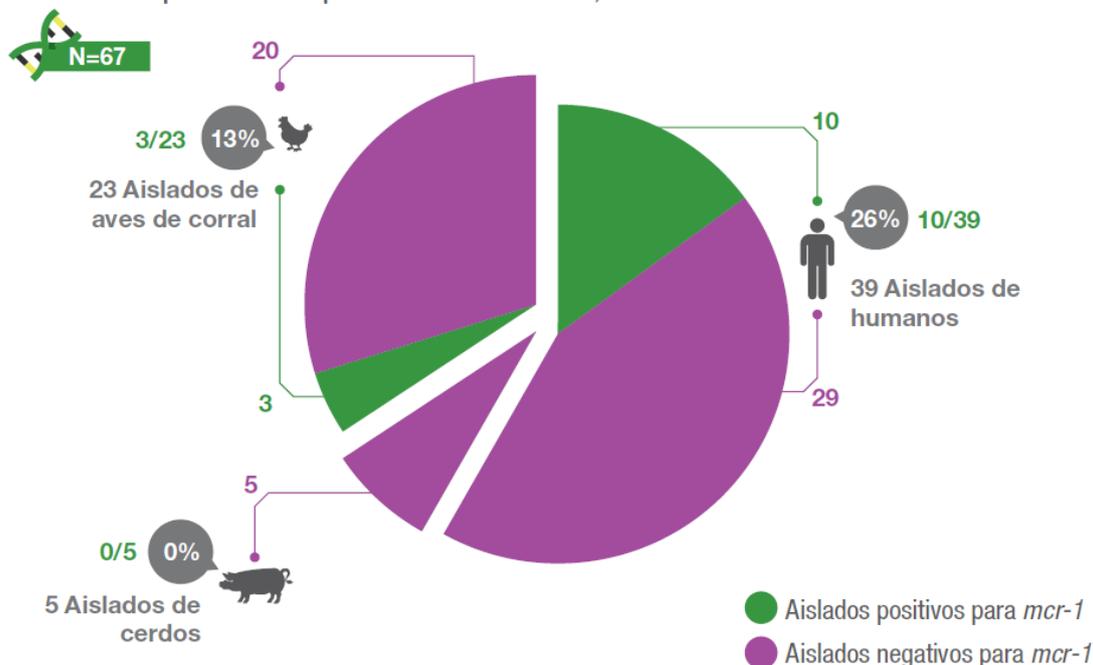


Figura 30. Frecuencia y distribución de *K. pneumoniae* portadoras del gen *mcr-1* con respecto a los hospederos del estudio, en comunidades de Pastaza.

4.8 Confirmación de genes *mcr* por secuenciación

Puesto que únicamente se encontró el gen *mcr-1* en la PCR, se seleccionaron al azar cinco muestras (Anexo 4) de los productos de PCR de 663 pb, con los

cuales se realizó la confirmación de este gen de resistencia. Los cinco productos de PCR fueron escogidos al azar entre las muestras de humanos del estudio.

Estas secuencias fueron comprobadas en BLASTn. El análisis de alineamiento determinó el porcentaje de identidad que para las 5 secuencias fue de 98,98% en promedio, todos los valores esperados (E value) fueron de 0,0 (*Tabla 6*), lo que significa que la coincidencia entre las secuencias del gen *mcr-1* depositadas en la base de datos GeneBank es altamente significativa con respecto a las secuencias obtenidas en este estudio.

Resultado que es similar al de Eltai y colaboradores 2018 que obtuvieron un 98% de identidad al gen *mcr-1* de *E. coli* cepa C2-007R. Las secuencias del estudio de Wang y colaboradores (2019) tuvieron un porcentaje de identidad del 99,9% con el gen *mcr-1.1* de secuencias encontradas en la base de datos GeneBank.

Porcentajes de identidad mayores reportaron Kieffer y colaboradores (2017), en donde sus secuencias tuvieron un 100% de identidad con la secuencia *mcr-1* depositada por Liu y colaboradores en el 2016. Mismos resultados fueron informados por Irrgang y su grupo de trabajo (2016), que secuenciaron 10 productos de PCR que mostraron el 100% de identidad para el gen *mcr-1* descrito por el autor antes mencionado.

Tabla 6.

Análisis de secuencias *mcr-1* de *E. coli* de humanos en base a BLASTn

Aislado	Gen	% identidad	Valor esperado
<i>E. coli</i> humano M1	<i>mcr-1</i>	98,79%	0,0

<i>E. coli</i> humano M2	<i>mcr-1</i>	98,52%	0,0
<i>E. coli</i> humano M3	<i>mcr-1</i>	98,96%	0,0
<i>E. coli</i> humano M4	<i>mcr-1</i>	99,40%	0,0
<i>E. coli</i> humano M5	<i>mcr-1</i>	99,25%	0,0

La siguiente es una de las 5 secuencias obtenidas por medio de la secuenciación Sanger (663 pb):

AGAATACGCCGTCGATGTGCCGCCCGATGTGACATTGCTAAAATTGGTCA
CGCCATCGATCTTGGCAAGCTGTGGGAAAGTATCGCGCTCATAGCCATTG
AAGCTGACATCATCGGCGCGTGCCGTCTCACCGACGACGAACACCACTAG
GCGTGGCTTACGCATATCAGGCTTGGTTGCTTGTACCGCGTCTTTGGCGT
GATAAATGGTATCTTTTGGCGCACTGGCTTTTTTATACTCAATACTGGCAAG
CTTACCCACCGAGTAGATTGGCATGATCGGATTGACAAAGCTACGCAGCG
GCTTATGCACGCGAAAGAACTGGCATAATGACTGCTGAACGCCACCACA
GGCAGTAAAATCAGCGCAAGACTTGCCACGATCAAGCCCCATCGGCGCAT
CAAACCCTTGCCCCAAGTCGGATAATCCACCTTAACAAAARCCACAAGCAA
ACTTGGTAGCACACCCAAACCAATGATACGCCTGATAAACGCTGCGTTTAA
TAGATCCTTGGTCTCGGCTTGGTCGGTCTGTAGGGCATTTTGGAGCATGG
TCGTATCATAGACCGTGCCATAAGTGTCAGTAAATAACTGGTCACCGCGC
CCATGATTAATAGCAAATCAACACAGGCTAGAGCACATAGCGATACGATG
ATAACAG

4.9 Análisis estadístico

Se determinaron los intervalos de confianza obtenidos de los aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* en cada uno de los hospederos del estudio (*Tabla 7*). Con una

confianza del 95%, cada uno de los intervalos de confianza contiene el valor de p de las proporciones de los aislados.

En la *Tabla 8* se resumen las frecuencias de *E. coli* y *K. pneumoniae* que albergan el gen *mcr-1*. De la misma forma los intervalos de confianza contienen a cada una de las proporciones presentadas en la tabla.

Tabla 7.

Resumen de los resultados obtenidos de los aislados del estudio, según los hospederos

HOSPEDERO	AISLADO	FRECUENCIA	PREVALENCIA	IC
		AISLADOS	AISLADOS	
Humanos	<i>E. coli</i>	116/137	0,85	$0,79 < p < 0,91$
	<i>K. pneumoniae</i>	99/137	0,72	$0,64 < p < 0,80$
Cerdos	<i>E. coli</i>	128/147	0,87	$0,82 < p < 0,92$
	<i>K. pneumoniae</i>	22/147	0,15	$0,09 < p < 0,21$
Aves de corral	<i>E. coli</i>	134/154	0,87	$0,82 < p < 0,92$
	<i>K. pneumoniae</i>	43/154	0,28	$0,21 < p < 0,35$
Población total	<i>E. coli</i>	378/438	0,86	$0,83 < p < 0,86$
	<i>K. pneumoniae</i>	164/438	0,37	$0,32 < p < 0,42$

Nota: IC: Intervalo de confianza

Tabla 8.

Resumen de los resultados obtenidos de la prevalencia de *mcr-1*, según los hospederos

HOSPEDERO	AISLADO	FRECUENCIA	PREVALENCIA	IC
		<i>mcr-1</i>	<i>mcr-1</i>	
Humanos	<i>E. coli</i>	111/116	0,96	$0,92 < p < 1,00$
	<i>K. pneumoniae</i>	21/99	0,21	$0,13 < p < 0,29$

Cerdos	<i>E. coli</i>	106/128	0,83	0,76< <i>p</i> <0,90
	<i>K. pneumoniae</i>	4/22	0,18	0,02< <i>p</i> <0,34
Aves de corral	<i>E. coli</i>	123/134	0,92	0,87< <i>p</i> <0,97
	<i>K. pneumoniae</i>	7/43	0,16	0,05< <i>p</i> <0,27
Población total	<i>E. coli</i>	340/378	0,90	0,87< <i>p</i> <0,93
	<i>K. pneumoniae</i>	32/164	0,2	0,14< <i>p</i> <0,26

Nota: IC: Intervalo de confianza

En base a la *Tabla 9*, en la prueba de Shapiro-Wilk se obtuvo un *p-value* de 0,32 para Pastaza y para Santo Domingo de los Tsáchilas un 0,84. Por lo tanto, se aceptó la hipótesis nula y se corroboró que los datos (prevalencia de *E. coli* portadoras de *mcr-1*) de ambas comunidades tienden a una distribución normal (*Tabla 9*), ya que los *p-value* obtenidos son superiores a 0,05.

Se obtuvo un *p-value* de 0,07 en la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene. En base a la hipótesis nula se confirmó que las varianzas son homogéneas en los dos grupos de datos evaluados de la *Tabla 9*, ya que el dato obtenido fue mayor a 0,05.

Finalmente, y puesto que las varianzas resultaron homogéneas, la prueba de “*t de student*”, obtuvo un *p-value* de 0,11. El valor de $p > 0,05$ se consideró estadísticamente no significativo. Esto quiere decir que no existen diferencias significativas en las tasas de detección de los genes *mcr-1* en ambas regiones de estudio.

Tabla 9.

Prevalencias de *E. coli* portadoras de *mcr-1* en las dos regiones del estudio, según hospederos.

Localidad	PH	PC	PA	SH	SC	SA
Prev. <i>mcr-1</i> en <i>E. coli</i>	91% (53/58)	69% (37/57)	87% (59/68)	100% (58/58)	93% (69/74)	97% (64/66)

Nota: **PH:** prevalencia de *mcr-1* en humanos de Pastaza, **PC:** prevalencia de *mcr-1* en cerdos de Pastaza, **PA:** prevalencia de *mcr-1* en aves de corral de Pastaza; **SH:** prevalencia de *mcr-1* en humanos Santo Domingo de los Tsáchilas; **SC:** prevalencia de *mcr-1* en cerdos de Santo Domingo de los Tsáchilas, **SA:** prevalencia de *mcr-1* en aves de corral de Santo Domingo de los Tsáchilas.

4.10 Comparación de métodos fenotípicos y moleculares para la detección de resistencia a colistina

4.10.1 *E. coli* portadoras del gen *mcr-1* que presentaron resistencia fenotípica

Las dos *E. coli* con visible resistencia fenotípica a colistina también fueron portadoras del gen *mcr-1* en una proporción de 0,6% (2/340), En el estudio de Moawad y colaboradores (2018), las *E. coli* portadoras del gen *mcr-1*, que fueron fenotípicamente resistentes a la colistina tuvieron una proporción del 8,9%. Este resultado también es mayor que otros estudios que reportan *E. coli* portadoras de *mcr-1*, que también son resistentes fenotípicamente a colistina. Uno de esos es el estudio realizado en Francia, en aislados de cerdos, aves de corral y pavos con un 0,5%, 1,8% y 5,9% de *E. coli* resistentes (Perrin-Guyomard et al., 2016). Adicionalmente, existe un estudio alemán que reporta un 5,6% de aislados de *E. coli* de pollos de engorde en este país con la misma característica (Irrgang et al., 2016). Además, en otra investigación realizada en *E. coli* y *K. pneumoniae* aisladas de animales de producción en China, el 26,8% de *E. coli* que presentaron resistencia fenotípica por medio del gen *mcr-1* (R. Wang et al., 2018), lo cual apoya a estudios previos realizados en China y en Austria en

donde la mayoría de *E. coli* con resistencia fenotípica a colistina fueron portadoras del gen *mcr-1* (Allerberger et al., 2016; Huang et al., 2017).

Es interesante que solo pocos estudios informaron que *E. coli* portadora de *mcr-1* de humanos (Johnson et al., 2006) y cerdos (Fernandes et al., 2016) son fenotípicamente susceptibles a la colistina *in vitro*. La baja resistencia a colistina por medio de estas pruebas de susceptibilidad puede atribuirse a la supresión de genes *mcr* (Pham Thanh et al., 2016), o razones desconocidas (Liassine et al., 2016).

4.10.2 *K. pneumoniae* portadoras del gen *mcr-1* que presentaron resistencia fenotípica

En esta investigación, no se obtuvo ninguna *K. pneumoniae* (0/164) que albergue el gen *mcr-1* y presente un fenotipo de resistencia a colistina. Por el contrario, en China, el 3,75% de aislados de *K. pneumoniae* fueron portadores del gen *mcr-1* y presentaron resistencia fenotípica (R. Wang et al., 2018). Kieffer y colaboradores (2017) aislaron dos *K. pneumoniae* que albergaron el gen *mcr-1*, ambas fueron fenotípicamente resistentes a una concentración de 32µg/mL (Kieffer et al., 2017). Igualmente, Yang y colaboradores (2018) reportaron un 82% de bacterias fenotípicamente resistentes a colistina y portadoras del gen *mcr-1*.

Curiosamente, en el estudio de Hadjadj y su grupo de trabajo, también se reportó presencia de bacterias portadoras de *mcr-1* pero en algunas cepas, se observó que la alta resistencia fenotípica se debió a la presencia de mecanismos cromosómicos de resistencia adicionales. Estos mecanismos correspondieron a mutaciones cromosómicas en los genes *mgrB* y el sistema de dos genes *phoP/phoQ*, se constató que las bacterias con una MIC alta perdieron los

plásmidos que alojaba al gen *mcr-1* y no hubo un cambio en la MIC, por lo que se llegó a la conclusión de que este gen no fue vital para su supervivencia (Hadjadj et al., 2017).

Todos los resultados descritos anteriormente, respaldan los hallazgos obtenidos en esta investigación. Las dos *K. pneumoniae* no portadoras del gen *mcr-1* y visiblemente resistentes a colistina, posteriormente deberán ser sometidas a nuevas pruebas moleculares para confirmar los genes que les confieren esta resistencia.

4.10.3 Dificultades en el método de microdilución en caldo para la determinación de resistencia a colistina

A pesar de las décadas de uso de la colistina, tanto en medicina humana como veterinaria (Dalmolin et al., 2018; Kempf et al., 2013), el método óptimo de las pruebas de susceptibilidad para las polimixinas (colistina y polimixina B) aún no se ha definido. Estas pruebas para las polimixinas representan un reto en la actualidad, ya que con la reciente aparición de bacterias Gram negativas multirresistentes se necesita de métodos rápidos y confiables para determinar la susceptibilidad de los aislados a estos antibióticos, puesto que las infecciones ahora se asocian con una mayor mortalidad del paciente (Capone et al., 2013; Landman et al., 2013). Se presentan varias dificultades para determinar la susceptibilidad de los aislados hacia las polimixinas, entre esto se incluye la mala difusión del antibiótico en el agar, las propiedades catiónicas inherentes de las polimixinas, la aparición de hetero-resistencia a las polimixinas en muchas bacterias Gram negativas y la falta de un método que permita la comparación confiable de las pruebas (Hindler & Humphries, 2013; Landman et al., 2013).

La baja difusión en agar en pruebas con la colistina ha sido bien documentada y ha generado resultados inexactos (Gales et al., 2001), por lo que se recomienda no realizarla (Malbrán, 2017). La difusión en agar se dificulta debido a la naturaleza anfipática de las polimixinas y su alto peso molecular, lo que produce zonas de inhibición cortas (Malbrán, 2017). A pesar de esto, existen estudios en los que aún se realizan pruebas de susceptibilidad a la colistina por medio de la difusión en disco (Jayanti et al., 2017; Karimzadeh et al., 2017; Moawad et al., 2017; Purohit et al., 2017; Tohamy et al., 2018), lo que reduce la confiabilidad de cada uno de ellos. La metodología *E-test* en comparación a los métodos de dilución ha generado resultados con inaceptables tasas de error para *P. aeruginosa* (Hindler & Humphries, 2013), *A. baumannii* (Tan & Hg, 2007) y *K. pneumoniae* (Turnidge, Bell, & Jones, 2007).

Desde hace varios años la microdilución en caldo es el método “*gold standard*” de referencia recomendado por el CLSI (2018) y el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos EUCAST (2020), sin embargo, este método es laborioso y la preparación manual de soluciones antibióticas puede conducir a errores significativos (Poirel et al., 2017), en este estudio se prepararon las soluciones del antibiótico de forma manual, lo que aumenta el margen de error. Se han reportado resultados de MIC no reproducibles y no interpretables para especie de *Enterobacter* debido a la presencia de pocillos de salto (pocillos que no muestran crecimiento, mientras que a concentraciones más altas si se presenta crecimiento) (Landman et al., 2013), este fenómeno puede deberse a subpoblaciones hetero-resistentes de este género.

En la investigación de Karvanen y colaboradores (2017), la colistina, en los métodos de microdilución en caldo, se adsorbe en los materiales de laboratorio (que incluyen poliestireno, polipropileno y vidrio) de uso común, particularmente cuando el antibiótico se encuentra en concentraciones bajas. De hecho, estos investigadores demostraron que las polimixinas (colistina y polimixina B) se adhieren a las cargas negativas de las microplacas y esto provoca que los

resultados sean variables de forma significativa, por lo que es difícil establecer comparaciones. Es posible que esta sea una de las causas por las que en este estudio se obtuvo una baja prevalencia de bacterias resistentes fenotípicamente a colistina, ya que las concentraciones de antibióticos usadas fueron de 2 µg/mL y 4µg/mL. Humphries (2015) determinó que la composición del sulfato de colistina en polvo es variable entre lotes y con respecto a cada uno de los fabricantes; por lo tanto, esto también es una fuente potencial de variabilidad de los resultados.

Li y colaboradores (2006) revelaron en su estudio que el subcultivo de aislados resistentes a colistina en medios en ausencia del antibiótico (sin presión selectiva) provocaron la pérdida fenotípica de la resistencia en el 98% de aislados de una población de *A. baumannii*, después de un solo subcultivo. Hindler y Humphries (2013) también reportan que el congelamiento de los aislados provocó una pérdida de resistencia la colistina en los ensayos de microdilución en caldo. Entre los 25 aislamientos que inicialmente probaron ser resistentes por un método de dilución, cinco (20%) resultaron susceptibles por el mismo método después de la congelación.

4.11 Implicaciones del uso de antibióticos en la resistencia bacteriana. El caso de colistina:

Actualmente, se cree que la fuente auténtica de este gen es el animal doméstico productor de alimentos, puesto que a nivel global se ha encontrado una cantidad prominente de aislamientos provenientes de estos animales (Liu et al., 2016; Sun, Zhang, Liu, & Feng, 2018). Esta teoría, también está basada en características genéticas, puesto que el gen *mcr* se asocia estrechamente con la secuencia de inserción ISAp11 de *Pasteurella multocida*, patógeno animal bastante conocido, y los genes *florR* obtenidos a partir del aislamiento de Enterobacterias de origen animal (Poirel et al., 2016).

La razón del incremento de informes de resistencia a colistina, se debe al prolongado y discriminado uso de polimixinas (colistina y polimixina B) durante más de 50 años en medicina veterinaria (Elbediwi et al., 2019; Kempf et al., 2013), lo que crea un vínculo entre el uso veterinario de la colistina y la resistencia, ya no solo clínica sino también comunitaria (Poirel & Nordmann, 2016). Se ha reconocido también, que el uso de la colistina como promotor de crecimiento para producción animal es un motor para la aparición de bacterias que albergan el gen *mcr-1* (Liu et al., 2016).

Bacterias del tracto gastrointestinal y las heces de los animales juegan un papel muy importante en la persistencia y diseminación de estos genes hacia los humanos (Hartl et al., 2017; B. Liu et al., 2017; Pan et al., 2018), que también se han detectado en productos alimenticios (Nishino et al., 2017) y aguas residuales (Caltagirone et al., 2017) por lo que la implementación temprana del enfoque “Una Salud” es indispensable.

La *Figura 31* muestra las regiones, a nivel mundial, de la OIE (2018), en donde se diferencia que las Américas, Asia, el Lejano Oriente y Oceanía tienen las mayores proporciones de países que usan antibióticos como promotores de crecimiento.

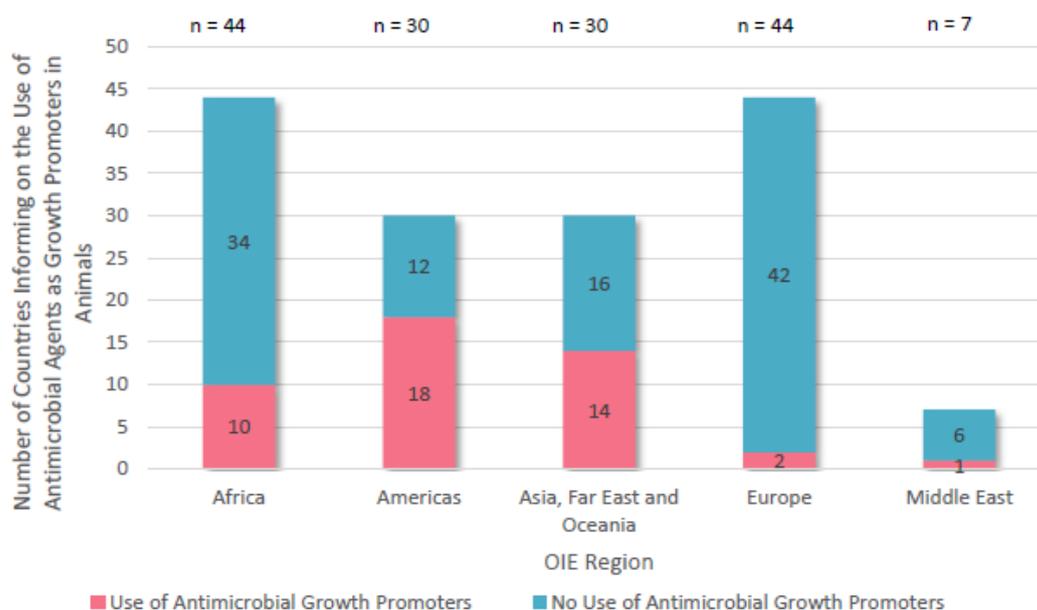


Figura 31. Número de países que utilizan agentes antimicrobianos para la promoción de crecimiento en animales en 2017, de 155 países que respondieron, por región de la OIE.

Tomado de: World Organization for Animal Health, 2018

El reporte realizado por la OIE (2018) muestra que el uso de antimicrobianos como promotores de crecimiento disminuyó de 60 a 45 países desde el informe presentado en 2017. Sin embargo, antimicrobianos datados como de “Importancia Crítica y Prioridad Máxima”, como la colistina, continúa siendo utilizada de manera frecuente en varias regiones. En consecuencia, Este antibiótico considerado eficaz se encuentra comprometido, tanto para las prácticas en medicina veterinaria como en medicina humana (OIE, 2019).

Actualmente, Europa es uno de las regiones pertenecientes a la OIE con menor incidencia de países que usan antibióticos como promotores de crecimiento, puesto que durante muchos años trabajaron para erradicar estas prácticas OIE (2018). Debido a que desde el reporte de Liu y colaboradores (2016), la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) retiró todos los

medicamentos veterinarios a base de colistina para su administración oral y se centró en la reducción del consumo de este antibiótico (AEMPS, 2015).

E. coli es hasta ahora el mayor reservorio de genes *mcr-1* transportados por plásmidos entre animales, humanos y el ambiente, lo que es motivo de preocupación, ya que esta bacteria se intercambia fácilmente desde el ambiente hacia los humanos y se mantiene como comensal en la flora intestinal (Poirel & Nordmann, 2016). Los viajes internacionales a países, en donde existen prevalencias elevadas del gen *mcr-1* (China, Japón, Estados Unidos, Italia, entre otros) por parte de turistas, importación de alimentos provenientes de países que tienen problemas de contaminación en alimentaria (Grami et al., 2016; Nishino et al., 2017) y la prescripción excesiva de colistina en medicina humana en países como Argentina, para tratar patógenos clínicos multirresistentes (Rapoport et al., 2016) son otras de las agravantes para que la resistencia a colistina se haya diseminado en poco tiempo a nivel mundial.

El gen *mcr-1* es uno de los pocos y claros ejemplos del origen animal de un rasgo de resistencia que ya está afectando a los sistemas de salud humana. Al parecer la aparición de resistencia a colistina de aislados provenientes de animales fue subestimada y no reconocida durante años (Liu et al., 2016; Sun et al., 2018). Por esto, el impacto del uso de este antibiótico en medicina veterinaria no se tomó en cuenta seriamente, hasta que se presentó la necesidad crítica por conservarlo como última opción terapéutica en humanos. Es por esto que es vital una reevaluación coordinada del uso de colistina en animales para evitar la diseminación de esta resistencia, sobre todo en países en vías de desarrollo (Poirel & Nordmann, 2016).

A pesar de los esfuerzos realizados por organismos como WHO, FAO y OIE, queda un largo camino por recorrer antes de que pueda implementarse el enfoque “Una Salud” totalmente integrado, para combatir la resistencia a los

antimicrobianos a nivel mundial. Entre los retos más destacables se encuentran los intereses entre múltiples sectores y las empresas, las deficiencias en la vigilancia de resistencia a los antimicrobianos, las políticas de uso de medicamentos y el control de infecciones de varias partes del mundo (Collignon & McEwen, 2019).

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

En este estudio, los aislados de *Escherichia coli* tuvieron una prevalencia total del 86% en los hospederos (humanos, cerdos y aves de corral), siendo los humanos los que presentaron mayor prevalencia de la bacteria.

La prevalencia de *Klebsiella pneumoniae* fue del 37% en el estudio, la cual es colonizador normal en humanos, pero en animales su prevalencia muestra menores proporciones que *Escherichia coli*.

Los cebadores diseñados *in silico* demostraron gran especificidad para los genes *mcr-1* y gen *mcr-4* en los ensayos moleculares.

Los métodos moleculares, son la metodología aceptada para la detección de los genes *mcr* y en este estudio demostraron una prevalencia total de bacterias portadoras del gen *mcr-1* del 68,3% (372/542).

Por las complicaciones del método de microdilución en caldo realizado con puntos de corte 2µg/mL y 4µg/mL, se reveló una baja proporción (0,74%) de resistencia fenotípica a colistina, la cual puede ser irreal.

Existe un aumento significativo de *Escherichia coli* portadoras del gen *mcr-1* en relación a los datos informados por otros autores en las mismas zonas.

La prevalencia total de *E. coli* en comunidades rurales del Ecuador es del 90%.

Se detectó, por primera vez en el país, *Klebsiella pneumoniae* portadoras del gen *mcr-1* con una prevalencia del 20%, lo que demuestra la rápida diseminación interespecies de este gen.

Las secuencias analizadas en la plataforma BLASTn mostraron en promedio un 98,8% de identidad con las secuencias depositadas en GeneBank por otros autores. De esta forma, se demostró que el amplicón obtenido corresponde al gen *mcr-1*.

5.2 Recomendaciones

Para mantener la presión selectiva intacta es importante usar todos los medios para aislamiento con colistina como suplemento. Debido a que existe un alto riesgo de que la bacteria pierda sus propiedades fenotípicas en los ensayos para determinar la resistencia fenotípica.

El método de microdilución en caldo es la metodología aceptada (*gold standard*) para la determinación de la resistencia fenotípica con el antibiótico colistina, se recomienda realizar diluciones seriadas para estos ensayos, debido a que la resistencia fenotípica de los microorganismos sobre este antibiótico es variable.

Para detectar la resistencia a colistina se recomienda usar métodos moleculares por sobre el de microdilución en caldo debido a las dificultades que se presentan en el desarrollo de los ensayos.

Para determinar la identidad de los microorganismos de interés es relevante el uso de métodos de detección rápida como MALDI-TOF y VITEK®. Esto evitaría el subcultivo de las especies de interés reduciendo el margen de error.

La detección del gen *mcr-1* en otros patógenos de importancia clínica como *Pseudomonas aeruginosa* o *Salmonella* es necesaria para determinar el estado de la diseminación de este gen.

Evaluar la clonalidad de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* para determinar si existe un patrón de diseminación específico.

Determinar el mecanismo de resistencia que poseen las dos *Klebsiella pneumoniae* fenotípicamente resistentes a colistina, mediante el análisis molecular de genes *mgrB*, *phoP/phoQ* y *pmrA/pmrB* que producen mutaciones cromosómicas en las bacterias.

Es importante aumentar muestras provenientes de otras comunidades rurales de Ecuador, para conocer el estado de la resistencia a colistina a nivel país.

Es necesario, también, ampliar el estudio en muestras ambientales, alimentos y ambientes intra-hospitalarios, ya que de esta forma se estaría abarcando el enfoque “Una Salud”; y se determinaría el estado de la resistencia a colistina de manera integral.

Referencias

- AEMPS. (2015). Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de noviembre de 2001, por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos para uso humano. Recuperado el 18 marzo de 2019 de <https://www.aemps.gob.es/industria-farmaceutica/dispositivos-de-seguridad-de-medicamentos-de-uso-humano/>
- Aghapour, Z., Gholizadeh, P., Ganbarov, K., Bialvaei, A. Z., Mahmood, S. S., Tanomand, A., Kafil, H. S. (2019). *Molecular mechanisms related to colistin resistance in enterobacteriaceae*. *Infection and Drug Resistance*, 12, 965–975.
- Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario. (2019). AGROCALIDAD prohíbe el uso del antibiótico colistina para uso o consumo animal. Recuperado el 27 de marzo de 2019 de https://www.paho.org/ecu/index.php?option=com_content&view=article&id=2154:agrocalidad-prohibe-el-uso-del-antibiotico-colistina-para-uso-o-consumo-animal&Itemid=360
- Aguayo, A., Mella, S., Riedel, G., Bello, H., Domínguez, M., & González-Rocha, G. (2016). Colistín en la era post-antibiótica. *Revista Chilena de Infectología*, 33(2), 166–176. Recuperado el 12 de febrero de 2019 de <https://doi.org/10.4067/S0716-10182016000200006>
- Alba, P., Leekitcharoenphon, P., Franco, A., Feltrin, F., Ianzano, A., Caprioli, A., Battisti, A. (2018). *Molecular epidemiology of mcr-encoded colistin resistance in Enterobacteriaceae from food-producing animals in Italy revealed through the EU harmonized antimicrobial resistance monitoring*. *Frontiers in Microbiology*. Recuperado el 9 de junio de 2019 de <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01217>
- Alkeskas, A., Ogrodzki, P., Saad, M., Masood, N., Rhoma, N. R., Moore, K., Forsythe, S. (2015). *The molecular characterisation of Escherichia coli K1 isolated from neonatal nasogastric feeding tubes*. *BMC Infectious Diseases*, 15(1). Recuperado el 27 de abril de 2019 de <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1210-7>
- Allerberger, F., Weissensteiner, G., Springer, B., Schlagenhafen, C., Lassnig, H., Ruppitsch, W., & Jelovcan, S. (2016). *Plasmid-mediated colistin-resistance in Escherichia coli isolated from poultry and broiler meat in Austria in 2016*. *International Journal of Infectious Diseases*, 53, 36–37. Recuperado el 1 de mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.11.099>
- Andrews, J. M. (2001). *Determination of minimum inhibitory concentrations*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(1), 1–12. Recuperado el 7 de marzo de 2019 de https://academic.oup.com/jac/article/48/suppl_1/5/2473513
- Arcilla, M. S., van Hattem, J. M., Matamoros, S., Melles, D. C., Penders, J., de

- Jong, M. D., & Schultsz, C. (2016). *Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. The Lancet Infectious Diseases, 16*(2), 147–149. Recuperado el 26 de febrero de 2019 de [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00541-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00541-1)
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibensouda, S. K. (2016). *Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis, 6*(2), 71–79. Recuperado el 9 de mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Becton Dickinson. (2003). Instrucciones de uso-medios en placa listos para usar: *Triple Sugar Iron Agar (TSI Agar)*. Recuperado el 14 de junio de 2019 de <https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/ES-PA-254458.pdf>
- Becton Dickinson. (2006). *BBL MR-VP Broth*. Recuperado el 14 de junio de 2019 de [http://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007474\(06\)\(0506\).pdf](http://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007474(06)(0506).pdf)
- Becton Dickinson. (2007). *BBL Urea Agar Base*. Recuperado el 14 de junio de 2019 de [https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/L007521\(08\)\(0907\)_ES.pdf](https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/L007521(08)(0907)_ES.pdf)
- Becton Dickinson. (2008). *BBL SIM MédiuM*. Recuperado el 18 de marzo de 2019 de http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/L007503%2808%29%280408%29_ES.pdf
- Becton Dickinson. (2013). *MacConkey Agar*. Recuperado el 7 de marzo de 2019 de <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8770>
- Becton Dickinson. (2015). *BBL Simmons Citrate Agar Slants*. Recuperado el 16 de julio de 2019 de <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=22360>
- Becton Dickinson. (2017). BBL Reactivo de Indol en Gotarios. Recuperado el 21 de julio de 2019 de [https://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L001142\(03\).pdf](https://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L001142(03).pdf)
- Becton Dickinson BD. (2013). *EMB Agar (Eosin Methylene Blue Agar), Modified*. Recuperado el 24 de agosto de 2019 de <https://www.bd.com/resource.aspx%3FIDX%3D8765>
- Belaynehe, K. M., Shin, S. W., Park, K. Y., Jang, J. Y., Won, H. G., Yoon, I. J., & Yoo, H. S. (2018). *Emergence of mcr-1 and mcr-3 variants coding for plasmid-mediated colistin resistance in Escherichia coli isolates from food-producing animals in South Korea. International Journal of Infectious Diseases, 72*, 22–24. Recuperado el 1 de agosto de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.05.011>
- Benedict, R., & Langlykke, A. (1947). *Antibiotic activity of Bacillus polymyxa. J Bacteriol, 1*(24). Recuperado el 17 de septiembre de 2019 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20344246>

- Berglund, B., Chen, B., Tärnberg, M., Sun, Q., Xu, L., Welander, J., Nilsson, L. E. (2018). *Characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli harboring mcr-1 and toxin genes from human fecal samples from China*. *Future Microbiology*, 13(15), 1647–1655. Recuperado el 21 de agosto de 2019 de <https://doi.org/10.2217/fmb-2018-0242>
- Bialvaei, A. Z., & Samadi Kafil, H. (2015). *Colistin, mechanisms and prevalence of resistance*. *Current Medical Research and Opinion*, 31(4), 707–721. Recuperado el 3 de septiembre de 2019 de <https://doi.org/10.1185/03007995.2015.1018989>
- Bilal, A., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Rasool, M. H., Nisar, M. A., Qamar, M. U. (2018). *Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis*. *Infection and Drug Resistance*, 1645–1658.
- Biswas, S., Brunel, J. M., Dubus, J. C., Reynaud-Gaubert, M., & Rolain, J. M. (2012). *Colistin: An update on the antibiotic of the 21st century*. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, Vol. 10, pp. 917–934. Recuperado el 31 de septiembre de 2019 de <https://doi.org/10.1586/eri.12.78>
- Bogdanovich, T., Adams-Haduch, J. M., Tian, G. B., Nguyen, M. H., Kwak, E. J., Muto, C., & Doi, Y. (2011). *Colistin-resistant, Klebsiella pneumoniae Carbapenemase (KPC)-producing Klebsiella pneumoniae belonging to the international epidemic clone ST258*. *Clinical Infectious Diseases*, 53(4), 373–376. Recuperado el 21 de julio de 2019 de <https://doi.org/10.1093/cid/cir401>
- Borowiak, M., Fischer, J., Hammerl, J. A., Hendriksen, R. S., Szabo, I., & Malorny, B. (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*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(12), 3317–3324. Recuperado el 1 de mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1093/jac/dkx327>
- Brink, A. J., Richards, G. A., Colombo, G., Bortolotti, F., Colombo, P., & Jehl, F. (2014). *Multicomponent antibiotic substances produced by fermentation: Implications for regulatory authorities, critically ill patients and generics*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 43(1), 1–6. Recuperado el 17 de octubre de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.06.013>
- Butler, M. S., Blaskovich, M. A., & Cooper, M. A. (2016). *Antibiotics in the clinical pipeline at the end of 2015*. *Journal of Antibiotics*, 70(1), 3–24. Recuperado el 2 de julio de 2019 de <https://doi.org/10.1038/ja.2016.72>
- Caltagirone, M., Nucleo, E., Spalla, M., Zara, F., Novazzi, F., Marchetti, V. M., Pagani, L. (2017). *Occurrence of extended spectrum β -lactamases, KPC-Type, and MCR-1.2-producing enterobacteriaceae from wells, river water, and wastewater treatment plants in Oltrepò Pavese area, Northern Italy*. *Frontiers in Microbiology*, 1–12. Recuperado el 8 de noviembre de 2019 de <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02232>

- Cannatelli, A., D'Andrea, M. M., Giani, T., Di Pilato, V., Arena, F., Ambretti, S., Rossolini, G. M. (2013). *In vivo emergence of colistin resistance in Klebsiella pneumoniae producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB regulator. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(11), 5521–5526. Recuperado el 3 de febrero de 2019 de <https://doi.org/10.1128/AAC.01480-13>
- Capone, A., Giannella, M., Fortini, D., Giordano, A., Meledandri, M., Ballardini, M., Petrosillo, N. (2013). *High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae infection accounts for an excess of mortality. Clinical Microbiology and Infection*, 19(1), Recuperado el 15 de agosto de 2019 de <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed11&NEWS=N&AN=2012755857>
- Carattoli, A., Villa, L., Feudi, C., Curcio, L., Orsini, S., Luppi, A., ... Magistrali, C. F. (2017). *Novel plasmid-mediated colistin resistance mcr-4 gene in Salmonella and Escherichia coli, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. Eurosurveillance*, 22(31), 1–5. Recuperado el 10 de octubre de 2019 de <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30589>
- Carroll, L. M., Gaballa, A., Guldemann, C., Sullivan, G., Henderson, L. O., & Wiedmann, M. (2019). *Identification of novel mobilized colistin resistance gene mcr-9 in a multidrug-resistant, colistin-susceptible salmonella enterica serotype typhimurium isolate. American Society for Microbiology*, 10(3), 1–6. Recuperado el 4 de noviembre de 2019 de <https://doi.org/10.1128/mBio.00853-19>
- Catry, B., Cavaleri, M., Baptiste, K., Grave, K., Grein, K., Holm, A., Edo, J. T. (2015). *Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. International Journal of Antimicrobial Agents*, 46(3), 297–306. Recuperado el 11 de marzo de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.06.005>
- Chauvin, C. (2010). *Étude des acquisitions vétérinaires contenant de médicaments d'élevages porcins dans un échantillon des antibiotiques naisseurs-engraisseurs année 2008 et comparaison 2008/2005*. Recuperado el 24 de abril de 2019 de anses.fr/fr/system/files/LABO-Ra-AntibioEtudPorcin.pdf
- CHROMagar. (2018). *Instructions For Use CHROMagar™ C3G R Instructions For Use*. Recuperado el 12 de abril de 2019 de http://www.chromagar.com/fichiers/1531986051NT_EXT_100_COL_APSE.pdf
- Clemente, L., Manageiro, V., Correia, I., Amaro, A., Albuquerque, T., Themudo, P., Caniça, M. (2019). *Revealing mcr-1-positive ESBL-producing Escherichia coli strains among Enterobacteriaceae from food-producing animals (bovine, swine and poultry) and meat (bovine and swine), Portugal, 2010–2015. International Journal of Food Microbiology*, 37–42. Recuperado

el 29 de julio de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.02.006>

- CLSI. (2018). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI supplement M100*. In *Clinical and Laboratory Standards Institute* (28th editi, Vol. 8). Recuperado el 18 de julio de 2019 de <https://doi.org/10.1108/08876049410065598>
- Collignon, P., Beggs, J. J., Walsh, T. R., Gandra, S., & Laxminarayan, R. (2018). *Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: a univariate and multivariable analysis. The Lancet Planetary Health*, 2(9). Recuperado el 16 de octubre de 2019 de [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(18\)30186-4](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(18)30186-4)
- Collignon, P., & McEwen, S. (2019). *One Health—Its Importance in Helping to Better Control Antimicrobial Resistance. Tropical Medicine and Infectious Disease*, 4(1), 22. Recuperado el 4 de noviembre de 2019 de <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4010022>
- Cooper, M. A., & Shlaes, D. (2011). *Fix the antibiotics pipeline. Nature*, 472(7341), 32. Recuperado el 6 de diciembre de 2019 de <https://doi.org/10.1038/472032a>
- Dalmolin, T. V, De Lima-Morales, D., & Barth, A. L. (2018). *Plasmid-mediated Colistin Resistance: What Do We Know? Journal of Infectiology*, 1(2), 16–22. Recuperado el 7 de diciembre de 2019 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- Davies, J. (1995). *Vicious circles: looking back on resistance plasmids. Genetics*, 139(4), 1465–1468.
- Davies, J., & Davies, D. (2010). *Origins and evolution of antibiotic resistance. MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, 74(3), 417–433. Recuperado el 26 de abril de 2019 de <https://doi.org/10.1128/mnbr.00016-10>
- Dixon, R. A., & Chopra, I. (1986). *Leakage of periplasmic proteins from Escherichia coli mediated by polymyxin B nonapeptide. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 29(5), 781–788. Recuperado el 28 de julio de 2019 de <https://doi.org/10.1128/AAC.29.5.781>
- Duggett, N. A., Randall, L. P., Horton, R. A., Lemma, F., Kirchner, M., Nunez-Garcia, J., Anjum, M. F. (2018). *Molecular epidemiology of isolates with multiple mcr plasmids from a pig farm in Great Britain: The effects of colistin withdrawal in the short and long term. Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(11). Recuperado el 31 de mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1093/jac/dky292>
- Eiamphungporn, W., Yainoy, S., Jumderm, C., Tan-arsuwongkul, R., Tiengrim, S., & Thamlikitkul, V. (2018). *Prevalence of the colistin resistance gene mcr-1 in colistin-resistant Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolated from humans in Thailand. Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 15. Recuperado el 13 de abril de 2019 de

<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.06.007>

- Eichhorn, I., Feudi, C., Wang, Y., Kaspar, H., Feßler, A. T., Lübke-Becker, A., Schwarz, S. (2018). *Identification of novel variants of the colistin resistance gene mcr-3 in Aeromonas spp. from the national resistance monitoring programme GERM-Vet and from diagnostic submissions. Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(5). Recuperado el 13 de agosto de 2019 de <https://doi.org/10.1093/jac/dkx538>
- Elbediwi, M., Li, Y., Paudyal, N., Pan, H., Li, X., Xie, S., Yue, M. (2019). *Global Burden of Colistin-Resistant Bacteria : Mobilized Colistin Resistance Genes Study (1980-2018). MDPI*, 7(461), 1–18.
- Eltai, N. O., Abdfarag, E. A., Al-Romaihi, H., Wehedy, E., Mahmoud, M. H., Alawad, O. K., ... Yassine, H. M. (2018). *Antibiotic Resistance Profile of Commensal Escherichia coli Isolated from Broiler Chickens in Qatar. Journal of Food Protection*, 81(2), 302–307. Recuperado el 23 de noviembre de 2019 de <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-191>
- EUCAST. (2020). *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters*. Recuperado el 14 de julio de 2019 de http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_5.0_Breakpoint_Table_01.pdf
- EUR-Lex. (2013). *Decisión de Ejecución de la Comisión, de 12 de noviembre de 2013 , sobre el seguimiento y la notificación de la resistencia de las bacterias zoonóticas y comensales a los antibióticos [notificada con el número C(2013) 7145]*. Recuperado el 15 de marzo de 2019 de <http://www.oie.int>
- European Medicines Agency. (2013). *Use of glycolcyclines in animals in the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health. European Medicines Agency*, 44(July), 13–14.
- Falagas, M. E., & Kasiakou, S. K. (2005). *Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. The Pediatric Infectious Disease Journal*, 24(10), 945. Recuperado el 9 de abril de 2019 de <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000174577.97635.7b>
- Falagas, M. E., Rafailidis, P. I., & Matthaiou, D. K. (2010). *Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. Drug Resistance Updates*, 13(4–5), 132–138. Recuperado el 19 de julio de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.drug.2010.05.002>
- Fernandes, M., Moura, Q., Sartori, L., Silva, K. C., Cunha, M. P., Esposito, F., Dropa, M. (2016). *Silent dissemination of colistin-resistant Escherichia coli in South America could contribute to the global spread of the mcr-1 gene. Eurosurveillance*, 21(17), 1–6. Recuperado el 21 de diciembre de 2019 de <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.17.30214>

- Fernandes, M. R., Cerdeira, L., Silva, M. M., Sellera, F. P., Muñoz, M., Junior, F. G., Lincopan, N. (2018). *Novel mcr-5.3 variant in a CTX-M-8-producing Escherichia coli ST711 isolated from an infected horse. Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 5–7. Recuperado el 25 de septiembre de 2019 de <https://doi.org/10.1093/jac/dky341>
- Fymat, A. L. (2017). *Antibiotics and Antibiotic Resistance. Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 1(1), 3–16. Recuperado el 30 de julio de 2019 de <https://doi.org/10.26717/bjstr.2017.01.000117>
- Gales, A. C., Castanheira, M., Jones, R. N., & Sader, H. S. (2012). *Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: Results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 73(4), 354–360. Recuperado el 27 de agosto de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.04.007>
- Gales, A., Reis, A., & Jones, R. N. (2001). *Contemporary Assessment of Antimicrobial Susceptibility Testing Methods for Polymyxin B and Colistin: Review of Available Interpretative Criteria and Quality Control Guidelines. The Economic Journal*, 39(1), 183–190. Recuperado el 20 de febrero de 2019 de <https://doi.org/10.2307/2224345>
- Giamarellou, H., & Poulakou, G. (2009). *Multidrug-resistant gram-negative infections: What are the treatment options? Drugs*, 69(14), 1879–1901. Recuperado el 22 de julio de 2019 de <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L355271722%5Cnhttp://dx.doi.org/10.2165/11315690-000000000-00000%5Cnhttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=00126667&id=doi:10.2165/11315690-000000000-00000&atitle=Multidrug>
- Giani, T., Sennati, S., Antonelli, A., Di Pilato, V., Di Maggio, T., Mantella, A., Rossolini, G. M. (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. *Eurosurveillance*, 23(45). Recuperado el 21 de septiembre de 2019 de <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.45.1800115>
- Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Naginienė, R., & Pavilonis, A. (2011). *Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria*. 137–146.
- Grami, R., Mansour, W., Mehri, W., Bouallègue, O., Boujaâfar, N., Madec, J., & Haenni, M. (2016). *Impact of food animal trade on the spread of mcr-1-mediated colistin resistance, tunisia, july 2015. Eurosurveillance*, 21(8), 1–5. Recuperado el 30 de agosto de 2019 de <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.8.30144>
- Gunn, J. S., Lim, K. B., Krueger, J., Kim, K., Guo, L., Hackett, M., & Miller, S. I. (1998). *PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. Molecular Microbiology*, 27(6), 1171–1182. Recuperado el 1 de abril de 2019 de <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00757.x>

- Hadjadj, L., Riziki, T., Zhu, Y., Li, J., Diene, S. M., & Rolain, J. M. (2017). *Study of mcr-1 gene-mediated colistin resistance in enterobacteriaceae isolated from humans and animals in different countries*. *Genes*, 8(12), 1–16. Recuperado el 18 de julio de 2019 de <https://doi.org/10.3390/genes8120394>
- Hancock, R. E. W. (1997). *The bacterial outer membrane as a drug barrier*. *Trends in Microbiology*, 5(1), 37–42. Recuperado el 29 de marzo de 2019 de [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(97\)81773-8](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(97)81773-8)
- Hancock, R. E. W., & Chapple, D. S. (1999). *Peptide Antibiotics*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(6), 1317–1323.
- Hartl, R., Kerschner, H., Lepuschitz, S., Ruppitsch, W., Allerberger, F., & Apfalter, P. (2017). *Detection of the mcr-1 gene in a multidrug-resistant Escherichia coli isolate from an Austrian patient*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(4), 1–8. Recuperado el 9 de noviembre de 2019 de <https://doi.org/10.1128/AAC.02623-16>
- Hindler, J. A., & Humphries, R. M. (2013). *Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant gram-negative bacilli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(6), 1678–1684. Recuperado el 15 de octubre de 2019 de <https://doi.org/10.1128/JCM.03385-12>
- Hmede, Z., & Kassem, I. I. (2018). *The Colistin Resistance Gene mcr-1 Is Prevalent in Commensal Escherichia coli Isolated from Preharvest Poultry in Lebanon*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(11), 1–4. Recuperado el 20 de julio de 2019 de <https://doi.org/10.1128/AAC.01304-18>
- Hollander, D. H., & Nell, E. E. (1954). *Improved preservation of Treponema pallidum and other bacteria by freezing with glycerol*. *Applied Microbiology*, 2(3), 164–170.
- Huang, X., Yu, L., Chen, X., Zhi, C., Yao, X., Liu, Y., Liu, J. H. (2017). *High prevalence of colistin resistance and mcr-1 gene in Escherichia coli isolated from food animals in China*. *Frontiers in Microbiology*, 8(APR), 1–5. Recuperado el 1 de enero de 2020 de <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00562>
- Humphries, R. M. (2015). *Susceptibility testing of the polymyxins: Where are we now?* *Pharmacotherapy*, 35(1), 22–27. Recuperado el 15 de octubre de 2019 de <https://doi.org/10.1002/phar.1505>
- Iglesias Parro, M. del R. (2018). *Resistencia a colistina en enterobacterias zoonóticas (Universidad de Extremadura)*. Recuperado el 9 de noviembre de 2019 de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=212832>
- Irrgang, A., Roschanski, N., Tenhagen, B. A., Grobbel, M., Skladnikiewicz-Ziemer, T., Thomas, K., ... Käsbohrer, A. (2016). *Prevalence of mcr-1 in E. coli from livestock and food in Germany, 2010-2015*. *PLoS ONE*, 11(7), 2010–2015. Recuperado el 18 de julio de 2019 de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159863>
- Jakobsen, L., Spangholm, D. J., Pedersen, K., Jensen, L. B., Emborg, H. D.,

- Agers, Y., Frimodt-Moller, N. (2010). *Broiler chickens, broiler chicken meat, pigs and pork as sources of ExPEC related virulence genes and resistance in Escherichia coli isolates from community-dwelling humans and UTI patients. International Journal of Food Microbiology, 142(1–2), 264–272.* Recuperado el 1 de abril de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.025>
- Jayanti, J., Nagen, K., Rajesh, K., Mahendra, G., & Enketeswara, S. (2017). *Genetic diversity study of various β -lactamase-producing multidrug-resistant Escherichia coli isolates from a tertiary care hospital using ERIC-PCR. Journal of Dental Education, 76(11), 1532–1539.* Recuperado el 21 de diciembre de 2019 de <https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR>
- Johnson, T. J., Wannemeuhler, Y. M., Scaccianoce, J. A., Johnson, S. J., & Nolan, L. K. (2006). *Complete DNA sequence, comparative genomics, and prevalence of an IncHI2 plasmid occurring among extraintestinal pathogenic Escherichia coli isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50(11), 3929–3933.* Recuperado el 27 de agosto de 2019 de <https://doi.org/10.1128/AAC.00569-06>
- Karimzadeh, I., Sadeghimanesh, N., Mirzaee, M., & Sagheb, M. M. (2017). *Evaluating the resistance pattern of gram-negative bacteria during three years at the nephrology ward of a referral hospital in Southwest of Iran. Journal of Nephropathology, 6(3), 210–219.* Recuperado el 2 de agosto de 2019 de <https://doi.org/10.15171/jnp.2017.35>
- Karvanen, M., Malmberg, C., Lagerbäck, P., Friberg, L. E., & Cars, O. (2017). *Colistin is extensively lost during standard in vitro experimental conditions. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 61(11).* Recuperado el 17 de noviembre de 2019 de <https://doi.org/10.1128/AAC.00857-17>
- Kasiakou, S. K., Michalopoulos, A., Soteriades, E. S., Samonis, G., Sermaides, G. J., & Falagas, M. E. (2005). *Combination therapy with intravenous colistin for management of infections due to multidrug-resistant gram-negative bacteria in patients without cystic fibrosis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49(8), 3136–3146.* Recuperado el 3 de noviembre de 2019 de <https://doi.org/10.1128/AAC.49.8.3136-3146.2005>
- Kempf, I., Fleury, M. A., Drider, D., Bruneau, M., Sanders, P., Chauvin, C., ... Jouy, E. (2013). *What do we know about resistance to colistin in Enterobacteriaceae in avian and pig production in Europe? International Journal of Antimicrobial Agents, 42(5), 379–383.* Recuperado el 5 de octubre de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.06.012>
- Kieffer, N., Aires-de-Sousa, M., Nordmann, P., & Poirel, L. (2017). *High rate of MCR-1-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae among pigs, Portugal. Emerging Infectious Diseases, 23(12), 2023–2029.* Recuperado el 21 de abril de 2019 de <https://doi.org/10.3201/eid2312.170883>
- Kieffer, N., Nordmann, P., Tissières, P., Poirel, L., Moreno, A. M., Moreno, L. Z., Breton, A. (2018). *Genetic and Functional Characterization of an MCR-3-Like Enzyme-Producing Escherichia coli Isolate Recovered from Swine in*

Brazil. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 62(7), 1–8.

- Koch-Weser, J., Sidel, V. W., Federman, E. B., Kanarek, P., Finer, D. C., & Eaton, A. E. (1970). *Adverse effects of sodium colistimethate. Manifestations and specific reaction rates during 317 courses of therapy. Annals of Internal Medicine*, 72(6), 857–868.
- Koneman, E. W., Washington C. Winn, S. D. A., Janda, W. M., Procop, G. W., Schrenckenberger, P. C., & Woods, G. L. (2008). *Diagnóstico microbiológico: Texto y Atlas en color (6th editio)*. Buenos Aires, Argentina.
- Kruglov, E. A., Gautam, S., Guerra, M. T., & Nathanson, M. H. (2011). *Type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor modulates bile salt export pump activity in rat hepatocytes. Hepatology*, 54(5), 1790–1799. Recuperado el 4 de enero de 2020 de <https://doi.org/10.1002/hep.24548>
- Laboratorios Britania. (2015). MR/VP Medio. Recuperado el 3 de enero de 2020 de https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a284327af905.pdf
- Lai, C. C., Lin, Y. T., Lin, Y. T., Lu, M. C., Shi, Z. Y., Chen, Y. S., Hsueh, P. R. (2018). *Clinical characteristics of patients with bacteraemia due to the emergence of mcr-1-harboursing Enterobacteriaceae in humans and pigs in Taiwan. International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(5), 651–657. Recuperado el 31 de noviembre de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.08.015>
- Landman, D., Georgescu, C., Martin, D. A., & Quale, J. (2008). *Polymyxins revisited. Clinical Microbiology Reviews*, 21(3), 449–465. Recuperado el 31 de noviembre de 2019 de <https://doi.org/10.1128/CMR.00006-08>
- Landman, D., Salamera, J., & Quale, J. (2013). *Irreproducible and uninterpretable polymyxin B MICs for enterobacter cloacae and enterobacter aerogenes. Journal of Clinical Microbiology*, 51(12), 4106–4111. Recuperado el 8 de septiembre de 2019 de <https://doi.org/10.1128/JCM.02129-13>
- Lawley, B., Otal, A., Moloney-Geany, K., Dian, A., Houghton, L., Heath, A. L. M., Tannock, G. W. (2019). *Fecal microbiotas of Indonesian and New Zealand children differ in complexity and bifidobacterial taxa during the first year of life. Applied and Environmental Microbiology*, 85(19). Recuperado el 24 de septiembre de 2019 de <https://doi.org/10.1128/AEM.01105-19>
- Laws, M., Shaaban, A., & Rahman, K. M. (2019). *Antibiotic resistance breakers: current approaches and future directions. FEMS Microbiology Reviews*, 43(5), 490–516. Recuperado el 30 de octubre de 2019 de <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz014>
- Lee, C. S., & Doi, Y. (2014). *Therapy of infections due to carbapenem-resistant gram-negative pathogens. Infection and Chemotherapy*, 46(3), 149–164. Recuperado el 23 de abril de 2019 de

<https://doi.org/10.3947/ic.2014.46.3.149>

- Li, J., Nation, R. L., Milne, R. W., Turnidge, J. D., & Coulthard, K. (2005). *Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. International Journal of Antimicrobial Agents*, 25(1), 11–25. Recuperado el 29 de abril de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.10.001>
- Li, J., Nation, R. L., Turnidge, J. D., Milne, R. W., Coulthard, K., Rayner, C. R., & Paterson, D. L. (2006). *Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. Lancet Infectious Diseases*, 6(9), 589–601. Recuperado el 13 de marzo de 2019 de [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70580-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70580-1)
- Li, J., Rayner, C. R., Nation, R. L., Owen, R. J., Spelman, D., Tan, K. E., & Liolios, L. (2006). *Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(9), 2946–2950. Recuperado el 31 de junio de 2019 de <https://doi.org/10.1128/AAC.00103-06>
- Liassine, N., Assouvie, L., Descombes, M. C., Tendon, V. D., Kieffer, N., Poirel, L., & Nordmann, P. (2016). *Very low prevalence of MCR-1/MCR-2 plasmid-mediated colistin resistance in urinary tract Enterobacteriaceae in Switzerland. International Journal of Infectious Diseases*, 51, 4–5. Recuperado el 16 de mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.08.008>
- Lim, S. K., Kang, H. Y., Lee, K., Moon, D. C., Lee, H. S., & Jung, S. C. (2016). *First detection of the mcr-1 gene in Escherichia coli isolated from livestock between 2013 and 2015 in South Korea. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(11), 6991–6993. Recuperado el 6 de julio de 2019 de <https://doi.org/10.1128/AAC.01472-16>
- Liu, B., Song, F. J., Zou, M., Zhang, Q. Di, & Shan, H. (2017). *High incidence of Escherichia coli strains coharboring mcr-1 and bla NDM from chickens. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(3). Recuperado el 8 de julio de 2019 de <https://doi.org/10.1128/AAC.02347-16>
- Liu, Y.-Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L., Zhang, R., Spencer, J., ... Shen, J. (2016). *Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. The Lancet. Infectious Diseases*, 16(2), 161–168. Recuperado el 23 de septiembre de 2019 de [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
- Madigan, M. Martinko, J. Bender, K. Buckley, D. Stahl, D. (2015a). *Biología de los microorganismos*. (14ta edición). Madrid, España: Pearson.
- Madigan, M. Martinko, J. Bender, K. Buckley, D. Stahl, D. (2015b). *Biología de los microorganismos* (14ta edición). Madrid, España: Pearson.
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P. V, & Clark, D. P. (2009). *Biología de los*

- microorganismos. In *Int Microbiol* (12va edición, Vol. 11). Madrid, España: Pearson.
- Malbrán, C. (2017). Desafíos en los Métodos de Evaluación de la Sensibilidad a Polimixinas (Colistina / Polimixina B). Recuperado el 7 de junio de 2019 de <https://doi.org/10.1111/1348->
- Mandrell, R. E., & Apicella, M. A. (1993). *Lipo-oligosaccharides (LOS) of mucosal pathogens: Molecular mimicry and host-modification of LOS. Immunobiology*, 187(3–5), 382–402. Recuperado el 10 de junio de 2019 de [https://doi.org/10.1016/S0171-2985\(11\)80352-9](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(11)80352-9)
- Manson, J. M., Hancock, L. E., & Gilmore, M. S. (2010). *Mechanism of chromosomal transfer of Enterococcus faecalis pathogenicity island, capsule, antimicrobial resistance, and other traits. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(27), 12269–12274. Recuperado el 13 de julio de 2019 de <https://doi.org/10.1073/pnas.1000139107>
- Marti, E., Variatza, E., & Balcazar, J. L. (2014). *The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. Trends in Microbiology*, 22(1), 36–41. Recuperado el 12 de octubre de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.11.001>
- Martis, N., Leroy, S., & Blanc, V. (2014). *Colistin in multi-drug resistant Pseudomonas aeruginosa blood-stream infections: A narrative review for the clinician. Journal of Infection*, 69(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.03.001>
- Mendes Oliveira, V. R., Paiva, M. C., & Lima, W. G. (2019). *Plasmid-mediated colistin resistance in Latin America and Caribbean: A systematic review. Travel Medicine and Infectious Disease*. Recuperado el 7 de febrero de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2019.07.015>
- Moawad, A. A., Hotzel, H., Awad, O., Tomaso, H., Neubauer, H., Hafez, H. M., & El-Adawy, H. (2017). *Occurrence of Salmonella enterica and Escherichia coli in raw chicken and beef meat in northern Egypt and dissemination of their antibiotic resistance markers. Gut Pathogens*, 9(1), 1–13. Recuperado el 14 de agosto de 2019 de <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0206-9>
- Moawad, A. A., Hotzel, H., Neubauer, H., Ehricht, R., Monecke, S., Tomaso, H., El-Adawy, H. (2018). *Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae from healthy broilers in Egypt: Emergence of colistin-resistant and extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli. Gut Pathogens*, 10(1), 1–12. Recuperado el 19 de octubre de 2019 de <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0266-5>
- Mourand, G., Jouy, E., Chauvin, C., Le Devendec, L., Paboeuf, F., & Kempf, I. (2018). *Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene among pigs: An experimental study. Veterinary Microbiology*, 221(April), 122–128. Recuperado el 12 de octubre de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.06.006>

- Munita, J., & Arias, C. (2016). *Mechanisms of Antibiotic Resistance*. *Microbiology Spectrum*, 1–20. Recuperado el 23 de septiembre de 2019 de https://doi.org/10.1142/9789813209558_0015
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2014). *Microbiología médica, murray 7ed* (7a edición). Barcelona: Elsevier Saunders.
- Nation, R. L., Garonzik, S. M., Li, J., Thamlikitkul, V., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Paterson, D. L., ... Silveira, F. P. (2016). *How do they perform? Clinical Infectious Diseases Advance Access*. *Clinical Infectious Diseases*, 1–23. Recuperado el 8 de septiembre de 2019 de <http://cid.oxfordjournals.org/>
- Nesporova, K., Jamborova, I., Valcek, A., Medvecky, M., Literak, I., & Dolejska, M. (2019). *Various conjugative plasmids carrying the mcr-5 gene in Escherichia coli isolates from healthy chickens in Paraguay*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(11), 3394–3397. Recuperado el 4 de enero de 2020 de <https://doi.org/10.1093/jac/dkz317>
- Nishino, Y., Shimojima, Y., Suzuki, Y., Ida, M., Fukui, R., Kuroda, S., ... Sadamasu, K. (2017). *Detection of the mcr-1 gene in colistin-resistant Escherichia coli from retail meat in Japan*. *Microbiology and Immunology*, 61(12), 554–557. Recuperado el 7 de junio de 2019 de <https://doi.org/10.1111/1348->
- O'Neill, J. (2014). *Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations*. *Review on Antimicrobial Resistance*, 4(December), 1–15. Recuperado el 24 de junio de 2019 de <https://doi.org/10.1038/510015a>
- OIE. (2019). Nuevo informe muestra un cambio a nivel mundial en el uso de antibióticos en animales: OIE - World Organization for Animal Health. Recuperado el 2 de enero de 2020 de https://www.oie.int/es/para-los-periodistas/comunicados-de-prensa/detalle/article/new-report-shows-global-shift-in-use-of-antibiotics-in-animals/?fbclid=IwAR3a0m-h_JtscMLAB8YiD705MmyljOSkN_NIPsmdTk5DGtjE8XiN_z2lods&cHash=3d425c9e8d
- Olaitan, A. O., Morand, S., & Rolain, J. M. (2014). *Mechanisms of polymyxin resistance: Acquired and intrinsic resistance in bacteria*. *Frontiers in Microbiology*, 1–19. Recuperado el 5 de noviembre de 2019 de <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00643>
- Ordooei Javan, A., Shokouhi, S., & Sahraei, Z. (2015). *A review on colistin nephrotoxicity*. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 71(7), 801–810. Recuperado el 26 de noviembre de 2019 de <https://doi.org/10.1007/s00228-015-1865-4>
- Organización Panamericana de la Salud, & Organización Mundial de la Salud. (2016). *Enterobacterias con resistencia transferible a colistina, implicaciones para la salud pública en las Américas* 1–5. Recuperado el 4 de diciembre de 2019 de <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2016/2016-jun-10-alerta-epi-enterob-resist.pdf>

- Ortega-Paredes, D., Barba, P., & Zurita, J. (2016). *Short report colistin-resistant Escherichia coli clinical isolate harbouring the mcr-1 gene in Ecuador. Epidemiology and Infection*, 144(14), 2967–2970. Recuperado el 7 de febrero de 2019 de <https://doi.org/10.1017/S0950268816001369>
- Padilla Chumacero, M. N. (2013). KLEBSIELLA PNEUMONIAE: AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS HOSPITAL “JAIME MENDOZA”. *Archivos Bolivianos de Medicina*, 19, 2–4.
- Pagès, J. M., James, C. E., & Winterhalter, M. (2008). *The porin and the permeating antibiotic: A selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. Nature Reviews Microbiology*, 6(12), 893–903. Recuperado el 8 de junio de 2019 de <https://doi.org/10.1038/nrmicro1994>
- Pan, H., Paudyal, N., Li, X., Fang, W., & Yue, M. (2018). *Multiple food-animal-borne route in transmission of antibiotic-resistant salmonella newport to humans. Frontiers in Microbiology*, 1–10. Recuperado el 9 de enero de 2019 de <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00023>
- Pérez Guerrero, P., Galán Sánchez, F., Gutiérrez Saborido, D., & Guerrero Lozano, I. (2014). Infecciones por enterobacterias. *Medicine (Spain)*, 11(55), 3276–3282. Recuperado el 25 de junio de 2019 de [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(14\)70768-1](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(14)70768-1)
- Perrin-Guyomard, A., Bruneau, M., Houée, P., Deleurme, K., Legrandois, P., Poirier, C., ... Sanders, P. (2016). *Prevalence of mcr-1 in commensal Escherichia coli from French livestock, 2007 to 2014. Eurosurveillance*, 21(6), 2014–2016. Recuperado el 19 de marzo de 2019 de <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.6.30135>
- Pham Thanh, D., Thanh Tuyen, H., Nguyen Thi Nguyen, T., Chung The, H., Wick, R. R., Thwaites, G. E., ... Holt, K. E. (2016). *Inducible colistin resistance via a disrupted plasmid-borne mcr-1 gene in a 2008 Vietnamese Shigella sonnei isolate. Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(8), 2314–2317. Recuperado el 26 de junio de 2019 de <https://doi.org/10.1093/jac/dkw173>
- Pogue, J. M., Lee, J., Marchaim, D., Yee, V., Zhao, J. J., Chopra, T., ... Kaye, K. S. (2011). *Incidence of and risk factors for colistin-associated nephrotoxicity in a large academic health system. Clinical Infectious Diseases*, 53(9), 879–884. Recuperado el 1 de febrero de 2019 de <https://doi.org/10.1093/cid/cir611>
- Poirel, L., Jayol, A., & Nordmann, P. (2017). *Polymyxins: Antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 30, pp. 557–596. Recuperado el 26 de noviembre de 2019 de <https://doi.org/10.1128/CMR.00064-16>
- Poirel, L., Kieffer, N., Brink, A., Coetze, J., Jayol, A., & Nordmann, P. (2016). *Genetic features of MCR-1-producing colistin-resistant Escherichia coli isolates in South Africa. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(7), 4394–4397. Recuperado el 31 de enero de 2019 de

<https://doi.org/10.1128/AAC.00444-16>

- Poirel, L., & Nordmann, P. (2016). *Emerging plasmid-encoded colistin resistance: The animal world as the culprit? Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(8), 2326–2327. Recuperado el 25 de junio de 2019 de <https://doi.org/10.1093/jac/dkw074>
- Poole, K. (2005). *Efflux-mediated antimicrobial resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, 20–51. Recuperado el 9 de enero de 2019 de <https://doi.org/10.1093/jac/dki171>
- Purohit, M. R., Chandran, S., Shah, H., Diwan, V., Tamhankar, A. J., & Lundborg, C. S. (2017). *Antibiotic resistance in an indian rural community: A 'one-health' observational study on commensal coliform from humans, animals, and water. International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(4), 1–13. Recuperado el 4 de diciembre de 2019 de <https://doi.org/10.3390/ijerph14040386>
- Qiagen. (2010). *Multiplex PCR In Qiagen ®*. Recuperado el 12 de octubre de 2019 de <https://doi.org/10.1111/j.1526-100X.2011.00825.x>
- Quiroga, C., Nastro, M., & Di Conza, J. (2018). *Current scenario of plasmid-mediated colistin resistance in Latin America. Revista Argentina de Microbiología*, 51(1), 93–100. Recuperado el 26 de junio de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.05.001>
- Rapoport, M., Faccone, D., Pasteran, F., Ceriana, P., Albornoz, E., Petroni, A., & Corso, A. (2016). *First Description of mcr-1 -Mediated Colistin Resistance in Human Infections Caused by Escherichia coli in Latin America . Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(7), 4412–4413. Recuperado el 7 de febrero de 2019 de <https://doi.org/10.1128/aac.00573-16>
- Rustigian, R., & Stuart, C. A. (1941). *Decomposition of Urea by Proteus. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 47(1), 108–112. Recuperado el 23 de septiembre de 2019 de <https://doi.org/10.3181/00379727-47-13054>
- Satlin, M. J., & Jenkins, S. G. (2017). *Polymyxins*. In *Infectious Diseases (Fourth Edition)* (pp. 1285–1288). Elsevier.
- Simmons, J. S. (1926). *A CULTURE MEDIUM FOR DIFFERENTIATING ORGAN-ISMS OF TYPHOID-COLON AEROGENES GROUPS AND FOR ISOLATION OF CERTAIN FUNGI * WITH COLORED PLATE. The Journal of Infectious Diseases*, Vol. 39, 2–4. Recuperado el 8 de junio de 2019 de <https://academic.oup.com/jid/article-abstract/39/3/209/795189>
- Singh, S. B., & Barrett, J. F. (2006). *Empirical antibacterial drug discovery - Foundation in natural products. Biochemical Pharmacology*, 71(7), 1006–1015. Recuperado el 6 de julio de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.12.016>
- Sinirtas, M., Akalin, H., & Gedikoğlu, S. (2009). *Investigation of colistin sensitivity via three different methods in Acinetobacter baumannii isolates with multiple*

- antibiotic resistance. International Journal of Infectious Diseases*, 13(5), 0–3. Recuperado el 25 de junio de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2008.12.012>
- Skov, R. L., & Monnet, D. L. (2016). *Plasmid-mediated colistin resistance (mcr-1 gene): Three months later, the story unfolds. Eurosurveillance*, 21(9), 1–6. Recuperado el 4 de enero de 2020 de <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.9.30155>
- Storm, D. R., Rosenthal, K. S., & Swanson, P. E. (1977). *Polymyxin and Related Peptide Antibiotics. Annual Review of Biochemistry*, 46(1), 723–763. Recuperado el 25 de junio de 2019 de <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.46.070177.003451>
- Suenaga, E., & Nakamura, H. (2005). *Evaluation of three methods for effective extraction of DNA from human hair. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 820(1), 137–141. Recuperado el 10 de agosto de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.11.028>
- Sun, J., Li, X. P., Fang, L. X., Sun, R. Y., He, Y. Z., Lin, J., ... Liu, Y. H. (2018). *Co-occurrence of mcr-1 in the chromosome and on an IncHI2 plasmid: persistence of colistin resistance in Escherichia coli. International Journal of Antimicrobial Agents*, 51(6), 842–847. Recuperado el 11 de enero de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.01.007>
- Sun, J., Zhang, H., Liu, Y.-H., & Feng, Y. (2018). *Towards Understanding MCR-like Colistin Resistance. Trends in Microbiology*, 26(9), 794–808. Recuperado el 28 de marzo de 2019 de <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.02.006>
- Sutherland, C. A., & Nicolau, D. P. (2015). *Susceptibility Profile of Ceftolozane/Tazobactam and Other Parenteral Antimicrobials Against Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, and Pseudomonas aeruginosa from US Hospitals. Clinical Therapeutics*, 37(7), 1564–1571. Recuperado el 8 de febrero de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2015.05.501>
- Tamayo, R., Choudhury, B., Septer, A., Merighi, M., Carlson, R., & Gunn, J. S. (2005). *Identification of cptA, a PmrA-regulated locus required for phosphoethanolamine modification of the Salmonella enterica serovar typhimurium lipopolysaccharide core. Journal of Bacteriology*, 187(10), 3391–3399. Recuperado el 4 de enero de 2020 de <https://doi.org/10.1128/JB.187.10.3391-3399.2005>
- Tan, T., & Hg, S. Y. (2007). *Comparison of Etest, Vitek and agar dilution for susceptibility testing of colistin. International Journal of Adolescence and Youth*, 13(5), 395–396. Recuperado el 20 de julio de 2019 de <https://doi.org/10.1080/02673843.1989.9747652>
- Tan, T., & Ng, S. (2006). *The in-vitro activity of colistin in gram-negative bacteria. Singapore Medical Journal*, 47(7), 621–624.

- Terragno, R., Caffer, M., & Binsztein, N. (2007). Manual de procedimientos, diagnóstico y caracterización de *Shigella* spp. *Departamento de Bacteriología. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. A.N.L.I.S. "Dr. Carlos G. Malbrán"*.
- Timmerman, T., Dewulf, J., Catry, B., Feyen, B., Opsomer, G., Kruif, A. de, & Maes, D. (2006). *Quantification and evaluation of antimicrobial drug use in group treatments for fattening pigs in Belgium. Preventive Veterinary Medicine, 74*(4), 251–263. Recuperado el 4 de enero de 2020 de <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.10.003>
- Tohamy, S. T., Aboshanab, K. M., El-Mahallawy, H. A., El-Ansary, M. R., & Afifi, S. S. (2018). *Prevalence of multidrug-resistant Gram-negative pathogens isolated from febrile neutropenic cancer patients with bloodstream infections in Egypt and new synergistic antibiotic combinations. Infection and Drug Resistance, 11*, 791–803. Recuperado el 21 de febrero de 2019 de <https://doi.org/10.2147/IDR.S163293>
- Triola, M. F. (2018). *Estadística* (12 edición). México: Pearson.
- Turnidge, J., Bell, J., & Jones, R. (2007). *Emergence of colistin-resistant Klebsiella spp. and Enterobacter spp. in the Asia-Pacific (APAC) region: a SENTRY antimicrobial surveillance program report (2006). American Society for Microbiology.*
- US Department of Health and Human Services - CDC. (2013). *Antibiotic resistance threats. In Centre for Disease Control and Prevention.* Recuperado el 17 de diciembre de 2019 de <https://doi.org/CS239559-B>
- Valdés, M. Á. S. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas, 16*(3), 402–419.
- Velkov, T., Roberts, K. D., Nation, R. L., Thompson, P. E., & Li, J. (2014). *Pharmacology of polymyxins: New insights into an 'old class of antibiotics. Future Microbiology, 8*(6), 711–724. Recuperado el 19 de enero de 2019 de <https://doi.org/10.2217/fmb.13.39>
- Velkov, T., Thompson, P. E., Nation, R. L., & Li, J. (2010). *Structure-activity relationships of polymyxin antibiotics. Journal of Medicinal Chemistry, 53*(5), 1898–1916. Recuperado el 27 de diciembre de 2019 de <https://doi.org/10.1021/jm900999h>
- Walkty, A., DeCorby, M., Nichol, K., Karlowsky, J. A., Hoban, D. J., & Zhanel, G. G. (2009). *In vitro activity of colistin (polymyxin E) against 3,480 isolates of gram-negative bacilli obtained from patients in Canadian hospitals in the CANWARD study, 2007-2008. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 53*(11), 4924–4926. Recuperado el 29 de abril de 2019 de <https://doi.org/10.1128/AAC.00786-09>
- Wang, R., Liu, Y., Zhang, Q., Jin, L., Wang, Q., Zhang, Y., Wang, H. (2018). *The prevalence of colistin resistance in Escherichia coli and Klebsiella*

- pneumoniae* isolated from food animals in China: coexistence of *mcr-1* and *bla*NDM with low fitness cost. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 51(5), 739–744. Recuperado el 8 de febrero de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.01.023>
- Wang, Xiaojuan, Liu, Y., Qi, X., Wang, R., Jin, L., Zhao, M., ... Wang, H. (2017). *Molecular epidemiology of colistin-resistant Enterobacteriaceae in inpatient and avian isolates from China: high prevalence of mcr-negative Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 50(4), 536–541. Recuperado el 1 de febrero de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.05.009>
- Wang, Xiaoming, Wang, Y., Zhou, Y., Li, J., Yin, W., Wang, S., ... Wang, Y. (2018). *Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, mcr-8, in NDM-producing Klebsiella pneumoniae* article. *Emerging Microbes and Infections*, 7(1), 1–9. Recuperado el 4 de enero de 2020 de <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0124-z>
- Wang, Z., Fu, Y., Schwarz, S., Yin, W., Walsh, T. R., Zhou, Y., ... Wang, S. (2019). *Genetic environment of colistin resistance genes mcr-1 and mcr-3 in Escherichia coli from one pig farm in China*. *Veterinary Microbiology*, 56–61. Recuperado el 23 de enero de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.01.011>
- Wise, M. G., Estabrook, M. A., Sahm, D. F., Stone, G. G., & Kazmierczak, K. M. (2018). *Prevalence of mcr-type genes among colistin-resistant Enterobacteriaceae collected in 2014-2016 as part of the INFORM global surveillance program*. *PLoS ONE*, 13(4), 1–8.
- Wooley, R. E., Brown, J., Gibbs, P. S., Nolan, L. K., & Turner, K. R. (1994). *Effect of Normal Intestinal Flora of Chickens on Colonization by Virulent Colicin V-Producing, Avirulent, and Mutant Colicin V-Producing Avian Escherichia coli*. *Avian Diseases*, 38(1), 141.
- World Health Organization. (2014). *ANTIMICROBIAL RESISTANCE: Global Report on Surveillance*. In *International Encyclopedia of Public Health*.
- World Health Organization. (2015). *Global Action Plan on Antimicrobial Resistance*. In *Microbe Magazine* (Vol. 10).
- World Health Organization. (2017a). *Critically important antimicrobials for human medicine, 5th revision*. Recuperado el 8 de febrero de 2019 de <http://who.int/foodsafety/publications/antimicrobials-fifth/en/>
- World Health Organization. (2017b). *La resistencia a los antimicrobianos*. Recuperado el 30 de octubre de 2019 de <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/es/>
- World Health Organization. (2017c). *One Health*. Recuperado el 30 de octubre de 2019 de <https://www.who.int/features/qa/one-health/en/>
- World Health Organization. (2018). *Critically Important Antimicrobials for Human Medicine*. Recuperado el 20 de noviembre de 2019 de

http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/cia/en/#.UiMEZ7zmSDA.mendeley

- World Organization for Animal Health. (2016). *The OIE Strategy on Antimicrobial Resistance and the Prudent Use of Antimicrobials*. World Organization for Animal Health, 1–12. Recuperado el 6 de noviembre de 2019 de http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/PortailAMR/EN_OIE-AMRstrategy.pdf
- World Organization for Animal Health. (2018). *Annual report on antimicrobial agents intended for use in animals* (Vol. 2). Recuperado el 8 de febrero de 2019 de <http://who.int/foodsafety/publications/antimicrobials-fifth/en/>
- Xavier, B. B., Lammens, C., Ruhai, R., Butaye, P., & Goossens, H. (2016). *Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in Escherichia coli, Belgium*. (June), 6–11.
- Yamamoto, Y., Calvopina, M., Izurieta, R., Villacres, I., Kawahara, R., Sasaki, M., & Yamamoto, M. (2019). *Colistin-resistant Escherichia coli with mcr genes in the livestock of rural small-scale farms in Ecuador*. *BMC Research Notes*, 12(1), 1–5. Recuperado el 19 de junio de 2019 de <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4144-0>
- Yang, Y. Q., Li, Y. X., Lei, C. W., Zhang, A. Y., & Wang, H. N. (2018). *Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-7.1 in Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(7), 1791–1795.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). *Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction*. *BMC Bioinformatics*, 13, 134.
- Yin, W., Li, H., Shen, Y., Liu, Z., Wang, S., Shen, Z., ... Wang, Y. (2017). *Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene mcr-3 in Escherichia coli*. *MBio*, 8(3), 4–9. Recuperado el 28 de octubre de 2019 de <https://doi.org/10.1128/mbio.00543-17>
- Yu, Z., Qin, W., Lin, J., Fang, S., & Qiu, J. (2015). *Antibacterial mechanisms of polymyxin and bacterial resistance*. *BioMed Research International*. Recuperado el 25 de enero de 2019 de <https://doi.org/10.1155/2015/679109>
- Zhang, J., Chen, L., Wang, J., Yassin, A. K., Butaye, P., Kelly, P., Wang, C. (2018). *Molecular detection of colistin resistance genes (mcr-1, mcr-2 and mcr-3) in nasal/oropharyngeal and anal/cloacal swabs from pigs and poultry*. *Scientific Reports*, 8(1), 1–9. Recuperado el 17 de diciembre de 2019 de <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22084-4>
- Zhang, X., Zhang, B., Guo, Y., Wang, J., Zhao, P., Liu, J., & He, K. (2019). *Colistin resistance prevalence in Escherichia coli from domestic animals in intensive*

breeding farms of Jiangsu Province. International Journal of Food Microbiology, 291(May 2018), 87–90. Recuperado el 14 de marzo de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.013>

Zhi, C., Lv, L., Yu, L.-F., Doi, Y., & Liu, J.-H. (2016). *Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. The Lancet Infectious Diseases*, 16(3), 292–293. Recuperado el 8 de octubre de 2019 de [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(16\)00063-3](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(16)00063-3)

Zinsstag, J., Meisser, A., Schelling, E., Bonfoh, B., & Tanner, M. (2012). *From “two medicines” to “One Health” and beyond. Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 79(2), 1–5. Recuperado el 16 de septiembre de 2019 de <https://doi.org/10.4102/ojvr.v79i2.492>

Zurfluh, K., Stephan, R., Widmer, A., Poirel, L., Nordmann, P., Nüesch, H. J., ... Nüesch-Inderbinen, M. (2017). *Screening for fecal carriage of MCR-producing Enterobacteriaceae in healthy humans and primary care patients. Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 6(1), 7–10. Recuperado el 24 de febrero de 2019 de <https://doi.org/10.1186/s13756-017-0186-z>

ANEXOS

Solicitud de revisión para el Comité de bioética de la USFQ



Código Estudio: CEISH-USFQ: 2019-117E



UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Lugar y Fecha: (llenar)

Yo, **Marco Rafael Coral Almeida**, solicito la revisión de mi protocolo de investigación:
"IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE LA RESISTENCIA A COLISTINA EN *Escherichia coli* Y *Klebsiella pneumoniae* AISLADAS DE HECES DE HUMANOS Y ANIMALES DE TRASPATIO EN COMUNIDADES RURALES DE LA COSTA Y AMAZONÍA ECUATORIANA. 2020-2021", que se sustenta en la siguiente documentación:

Documentos que se adjuntan a esta solicitud (ponga una X junto a los documentos que se adjuntan)				
Para todo estudio	Adjunto	Número páginas	Idioma	
			Inglés	Español
1. Solicitud de revisión				
2. Resumen del protocolo				
3. Formulario de Consentimiento Informado (FCI)				
4. Solicitud de no aplicación o modificación del FCI (<i>debe estar bien justificada</i>)				
5. Formulario de Asentimiento (FAI) (<i>para menores de 17 años</i>)				
6. Instrumentos a utilizar (<i>Especificar cada uno: entrevistas, cuestionarios, guías de xxx, hojas de recolección de datos, etc.</i>)				
7. Hojas de vida de los investigadores principales				
8. Otros (especifique)				
Solo para ensayos clínicos (si no aplica borrar)				
9. Manuales				
10. Brochures				
11. Seguros				
12. Información sobre el patrocinador				
13. Acuerdos de confidencialidad				
14. Informe técnico de la DIS-MSP				
15. Otros (<i>cualquier otro documento que sea relevante y pertinente</i>)				

Adjunto un resumen de mi protocolo de investigación, en el formato aprobado por el CEISH.

Atentamente,

Firma del investigador principal

Consentimiento informado

Formulario de Consentimiento Informado por escrito para almacenamiento de datos y uso de muestras biológicas en futuras investigaciones

Título de la investigación: Identificación y caracterización fenotípica y molecular de la resistencia a colistina en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* aisladas de heces de humanos y animales de traspatio en comunidades rurales de la costa y amazonía ecuatoriana 2020-2021.

Organizaciones que intervienen en el estudio: Universidad de Las Américas

Investigador Principal y datos de contacto: Marco Rafael Coral Almeida.

DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO
Introducción
<p>Estimado Sr o Sra:</p> <p>Usted ha sido invitado/a participar en el estudio “Identificación y caracterización fenotípica y molecular de la resistencia a colistina en <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> aisladas de heces de humanos y animales de traspatio en comunidades rurales de la costa y amazonía ecuatoriana” porque Ud. es una persona sana, mayor de edad y puede decidir si participar o no proveyéndonos una muestra de sus heces fecales.</p> <p>Usted, como participante del estudio (o representante del participante) autorizó con un consentimiento informado por escrito, la recolección de muestras biológicas.</p> <p>Sin embargo, requerimos que de manera específica autorice que:</p> <ol style="list-style-type: none">1) las muestras biológicas que sean recolectadas para este estudio, sean almacenadas por tres años; y2) que, durante el tiempo de almacenamiento, las muestras biológicas puedan ser utilizadas en otras investigaciones, relacionadas o no, con este estudio.
Propósito del estudio

El propósito del estudio para el cual usted aceptó donar su muestra, es saber si en sus heces fecales están presentes las bacterias *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* y si es sensible o resistente al antibiótico colistina. Hemos escogido este antibiótico por cuanto sabemos que es muy utilizado en esta comunidad en los alimentos para aves y ganado y que estas bacterias podrían contaminar a las personas por varias vías, como es el agua contaminada con las heces de estos animales. Seleccionaremos una muestra de personas adultas y sanas de esta comunidad.

Descripción de las muestras biológicas que serán recolectadas

Las muestras a ser recolectadas a las personas que voluntariamente participen, consistirán en heces fecales que se entregarán una única vez a los investigadores en un frasco colector que será repartido a cada participante previa explicación del procedimiento de colección de la muestra. La cantidad varía entre 0,5 gr a 2 gr mediante una paleta pequeña que viene en el frasco colector de heces.

Descripción del almacenamiento de las muestras biológicas

- Solo aquellas muestras que cuenten con un consentimiento informado específico para ser almacenadas, serán guardadas por tres años en los laboratorios de Investigación de la Universidad de las Américas en Quito, bajo la responsabilidad del investigador principal Marco Coral Almeida.
- Las condiciones en las que se almacenarán las muestras serán de congelamiento en tubos de 1,5 mL con caldo BHI y glicerol en los laboratorios de Investigación de la Universidad de las Américas en Quito.
- Todas las muestras serán codificadas alfanuméricamente para asegurar el anonimato.
- Una vez termine este estudio, que es para el cual se autorizó su recolección y análisis, las muestras que no cuenten con consentimiento informado para su almacenamiento, serán destruidas mediante esterilización con autoclave y tratado como desecho infeccioso en funda roja en los laboratorios de Investigación de la Universidad de las Américas en Quito, para su posterior destino final con un gestor ambiental certificado.
- Las muestras almacenadas y que cuenten con un consentimiento informado específico para uso en futuras investigaciones, podrán ser utilizadas siempre y cuando un CEISH, activo y debidamente aprobado por el MSP,

apruebe el nuevo estudio donde se utilicen las muestras biológicas previamente recolectadas y almacenadas.

Riesgos y beneficios

Riesgo de almacenamiento y uso futuro de las muestras biológicas.

El almacenamiento de las muestras biológicas no implica ningún riesgo, debido a que todas las muestras serán codificadas y al no contar con ningún identificador personal, no será posible identificar de manera alguna al sujeto al cual pertenecieron.

Para el uso de las muestras en futuras investigaciones tampoco habrá riesgo, porque se utilizarán las muestras ya codificadas y sin identificadores de ninguna clase.

Beneficios para el campo de la investigación.

Las muestras almacenadas para uso en futuros podrán ser utilizadas para generar nuevo conocimiento en los siguientes campos investigativos: Microbiología aplicada, Epidemiología, resistencia bacteriana, veterinaria, salud pública.

Confidencialidad de los datos

Para nosotros es muy importante mantener el anonimato del dueño de las muestras biológicas, por lo cual aplicaremos las medidas necesarias para que nadie conozca la identidad del dueño de dichas muestras, ni tenga acceso a sus datos personales o al de sus familiares.

1) Toda información y muestras recolectadas en este estudio tendrán un código en lugar de nombre, que asegurará la confidencialidad de la identidad del sujeto participante.

2) No se compartirá ni la información ni las muestras biológicas con ninguna persona que no pertenezca a este estudio, y aquella que se comparta con investigadores de futuros estudios será totalmente anónima.

3) El nombre del dueño de las muestras biológicas no será mencionado en ningún reporte o publicación.

3) El Comité de ética de la investigación en seres humanos (CEISH) de la USFQ, podrá tener acceso a sus datos en caso de que surgieran problemas en cuando a la seguridad y confidencialidad de la información o de la ética en el estudio.

Derechos y opciones del participante

Usted puede decidir si pueden **almacenarse y utilizarse las muestras biológicas**.

Si decide que se almacenen, debe consentir en este formulario de manera específica.

Asimismo, si decide que pueden utilizarse en futuras investigaciones, distintas de la presente o relacionada a este estudio, también debe consentir en este formulario de manera específica.

Además, aunque haya tomado la decisión de que se almacenen y-o utilicen las muestras en futuras investigaciones, puede luego decidir retirar su autorización en cualquier momento, sin ninguna consecuencia, pero debe firmar la revocatoria de su consentimiento en este formulario.

Usted no recibirá ningún pago ni tendrá que pagar absolutamente nada por dar su autorización para que el cuerpo de su familiar sea incluido en este estudio.

Información de contacto

Si usted tiene alguna pregunta sobre el estudio por favor envíe un correo electrónico a Clivia Alicia Guerrero Urbina Teléfono +593 987014202, correo electrónico c.guerrero05@ufromail.cl. [/clivia.guerrero@gmail.com](mailto:clivia.guerrero@gmail.com)

Si usted tiene preguntas sobre este formulario puede contactar al Dr. Iván Sisa, presidente del CEISH-USFQ USFQ, al siguiente correo electrónico: comitebioetica@usfq.edu.ec

**Consentimiento informado específico para
Almacenamiento de muestras biológicas y-o
Uso de muestras biológicas en futuras investigaciones**

Comprendo que como participante, me han solicitado que las muestras que se van a recolectar en el estudio Identificación y caracterización fenotípica y molecular de la resistencia a colistina en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* aisladas de heces de humanos y animales de traspatio en comunidades rurales de la costa y amazonía ecuatoriana 2020-2021, puedan ser almacenadas por tres años, sin identificación posible de la identidad a quien pertenecen, y también puedan ser utilizadas en futuras investigaciones relacionadas o no con este estudio. Todas mis preguntas fueron contestadas. Me permitieron contar con tiempo suficiente para tomar la decisión y me entregaron una copia de este formulario de consentimiento informado.

Consentimiento para almacenamiento de muestras

Al firmar este formulario, usted acepta voluntaria y gratuitamente que se almacenen las muestras recolectadas en este estudio. Al consentir, usted recibe una copia de este formulario.

**Doy mi consentimiento
mi consentimiento**

No doy

**Consentimiento para uso de muestras biológicas en futuras
investigaciones**

Al firmar este formulario, usted acepta voluntariamente que las muestras biológicas que se recolecten para los fines de este estudio, puedan utilizarse para futuras investigaciones. Al consentir, usted recibe una copia de este formulario.

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Doy mi consentimiento	No doy
mi consentimiento	
Nombres y apellidos del participante que consiente en el almacenamiento y-o uso de las muestras biológicas:	Fecha
Firma /huella	CC
Nombres y apellidos del testigo (si aplica)	Fecha
Firma /huella del testigo	CC
Nombres y apellidos del investigador:	Fecha:
Firma del investigador	CC
Revocatoria del consentimiento	
Nombres y apellidos del participante que originalmente dio su consentimiento para el almacenamiento y-o uso de las muestras biológicas, y que solicita la revocatoria de su previo consentimiento.	Fecha
Firma /huella del participante	CC
Nombres y apellidos del testigo (si aplica):	Fecha
Firma /huella del testigo	CC

Nombres y apellidos del investigador	Fecha
Firma del investigador	CC

Protocolo de extracción de ADN (Chelex)

- Colocar la muestra en un microtubo de 1,5mL.
- Centrifugar a 10000 rpm por 2 minutos.
- Descartar el sobrenadante.
- Colocar 200 μ L de chelex al 10% (usar una punta de 1000 μ L cortada en la punta para que pase el Chelex).
- Vortex por 2 minutos.
- Añadir 10 μ L de proteinasa K.
- Centrifugar a 10000 rpm por 2 minutos.
- Colocar el tubo en baño maría a 56°C por 1 hora.
- Vortex por 5 minutos.
- Centrifugar 10000 rpm por 2 minutos.
- Incubar en termobloque a 96°C por 20 minutos
- Vortex por 2 minutos.
- Centrifugar a 10000 rpm por 3 minutos.
- Retirar el sobrenadante y colocarlo en un microtubo nuevo de 1,5mL.
- Almacenar a -20°C.

Secuencias del gen *mcr-1*

Secuencia 1 (676 pb):

CGCTGTTATTATTGTATCGCTATGTGCTAAAGCCTGTGTTGATTTTGCTATT
AATCATGGGCGCGGTGACCAGTTATTTACTGACACTTATGGCACGGTTTA
TGATACGACCATGCTCCAAAATGCCCTACAGACCGACCAAGCCGAGACCA
AGGATTTATTAACGCAGCGTTTATCATGCGTATCATTGGTTTGGGTGTGC
TACCAAGTTTGCTTGTGGCTTTTGTTAAGGTGGATTATYCGACTTGGGGCA
AGGGTTTGATGCGCCGATTGGGCTTGATCGTGGCAAGTCTTGCGCTGATT
TACTGCCTGTGGTGGCGTTCAGCAGTCATTATGCCAGTTTCTTTCGCGTG
CATAAGCCGCTGCGTAGCTATGTCAATCCGATCATGCCAATTTACTCGGTG
GGTAAGCTTGCCAGTATTGAGTATAAAAAAGCCAGTGCGCCAAAAGATACC
ATTTATCACGCCAAAGACGCGGTACAAGCAACCAAGCCTGATATGCGTAA
GCCACGCCTAGTGGTGTGTTGTTGTCGGTGAGACGGCACGCGCCGATCATG
TCAGCTTCAATGGCTATGAGCGCGATACTTTCCACAGCTTGCCAAGATCG
ATGGCGTGACCAATTAGCAATGTCACATCGGGCGGCACATCGACGGCGT
ATTCTGTGCCGGTATG

Secuencia 2 (671 pb):

AACGCTGTTATTATTGTATCGCTATGTGCTAAAGCCTGGTGTGATTTTGCT
ATTAATCATGGGCGCGGTGACCAGTTATTTACTGACACTTATGGCACGGT
TTATGATACGACCATGCTCCAAAATGCCCTACAGACCGACCAAGCCGAGA
CCAAGGATCTATTAACGCAGCGTTTATCATGCGTATCATTGGTTTGGGTG
TGCTACCAAGTTTGCTTGTGGCTTTTGTTAAGGTGGATTATCCGACTTGGG
GCAAGGGTTTGATGCGCCGATTGGGCTTGATCGTGGCAAGTCTTGCGCTG

ATTTTACTGCCTGTGGTGGCGTTCAGCAGTCATTATGCCAGTTTCTTTTCGC
GTGCATAAGCCGCTGCGTAGCTATGTCAATCCGATCATGCCAATCTACTCG
GTGGGTAAGCTTGCCAGTATTGAGTATAAAAAAGCCAGTGCGCCAAAAGAT
ACCATTTATCACGCCAAAGACGCGGTACAAGCAACCAAGCCTGATATGCG
TAAGCCACGCCTAGTGGTGTGGTTGTCGGTGAGACGGCACGCGCCGATC
ATGTCAGCTTCAACGGCTATGAGCGCGATACTTTCCACAGCTTGCCAAGA
TCGATGGCGTGACCAATTTTAGCAATGTCACATCGTGCGGCACATCGACG
GCGTATTCTGTG

Secuencia 3 (666 pb):

CTGTTATCATCGTATCGCTATGTGCTAAAGCCTGTGTTGATTTTGCTATTAA
TCATGGGCGCGGTGACCAGTTATTTTACTGACACTTATGGCACGGTTTATG
ATACGACCATGCTYCAAATGCCCTACAGACCGACCAAGCCGAGACCAAG
GATCTATTAACGCAGCGTTTATCATGCGTATCATTGGTTTGGGTGTGCTA
CCAAGTTTGCTTGTGGCTTTTGTAAAGGTGGATTATCCGACTTGGGGCAAG
GGTTTGATGCGCCGATTGGGCTTGATCGTGGCAAGTCTTGCGCTGATTTTA
CTGCCTGTGGTGGCGTTCAGCAGTCATTATGCCAGTTTCTTTTCGCGTGCAT
AAGCCGCTGCGTAGCTATGTCAATCCGATCATGCCAATCTACTCGGTGGG
TAAGCTTGCCAGTATTGAGTATAAAAAAGCCAGTGCGCCAAAAGATACCAT
TTATCACGCCAAAGACGCGGTACAAGCAACCAAGCCTGATATGCGTAAGC
CACGCCTAGTGGTGTTCGTCGTCGGTGAGACGGCACGCGCCGATCATGT
CAGCTTCAATGGCTATGAGCGCGATACTTTCCACAGCTTGCCAAGATCGA
TGGCGTGACCAATTTAGCAATGTCACATCGTGCGGCACATCGACGGCGT
ATTCTGTG

Secuencia 4 (667 pb):

AAGCTGTTATTATCGTATCGCTATGTGCTAAAGCCTGTGTTGATTTTGCTAT
TAATCATGGGCGCGGTGACCAGTTATTTTACTGACACTTATGGCACGGTCT
ATGATACGACCATGCTCCAAAATGCCCTACAGACCGACCAAGCCGAGACC
AAGGATCTATTAAACGCAGCGTTTATCATGCGTATCATTGGTTTGGGTGTG
CTACCAAGTTTGCTTGTGGCTTTTGTAAAGGTGGATTATCCGACTTGGGGC
AAGGGTTTGATGCGCCGATTGGGCTTGATCGTGGCAAGTCTTGCGCTGAT
TTTACTGCCTGTGGTGGCGTTCAGCAGTCATTATGCCAGTTTCTTTTCGCGT
GCATAAGCCGCTGCGTAGCTATGTCAATCCGATCATGCCAATCTACTCGGT
GGGTAAGCTTGCCAGTATTGAGTATAAAAAAGCCAGTGCGCCAAAAGATAC
CATTTATCACGCCAAAGACGCGGTACAAGCAACCAAGCCTGATATGCGTAA
GCCACGCCTAGTGGTGTTCGTCGTCGGTGAGACGGCACGCGCCGATCAT
GTCAGCTTCAATGGCTATGAGCGCGATACTTTCCCACAGCTTGCCAAGATC
GATGGCGTGACCAATTtAGCAAAGTCACATTCGGCGGCACATCAACGGCG
TATTCTG

Bases de datos, resumen de resultados obtenidos

Tabla 10.

Resumen de resultados según hospedero y bacteria.

BASE DE DATOS <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i>						
AISLADO	HOSPEDEROS	N° MUESTRAS	Aislados confirmados	% Prev.	<i>mcr-1</i>	% Prev. <i>mcr-1</i>
<i>E. coli</i>	Humanos	137	116	85% (116/137)	111	96% (111/116)
	Cerdos	147	128	87% (128/147)	106	83% (106/128)
	Aves de corral	154	134	87% (134/154)	123	92% (123/134)
<i>K. pneumoniae</i>	Humanos	137	99	72% (99/137)	21	21% (21/99)
	Cerdos	147	22	15% (22/147)	4	18% (4/22)
	Aves de corral	154	43	28% (43/154)	7	16% (7/43)

Tabla 11.

Resumen de resultados según la población total

BASE DE DATOS <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i>							
AISLADO	HOSPEDEROS	N°	Aislados	% Prev.	MIC	<i>mcr-1</i>	% Prev <i>mcr-1</i>
		MUESTRAS	confirmados				
<i>E. coli</i>	Población total	438	378	86% (378/438)	2 resistentes	340	90% (340/378)
<i>K. pneumoniae</i>	Población total	438	164	37% (164/438)	2 resistentes	32	20% (32/164)

Tabla 12.

Resumen de resultados según la zona de estudio

BASE DE DATOS <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i>							
AISLADO	ZONA	N°	Aislados	% Prev.	<i>mcr-1</i>	% Prev <i>mcr-1</i>	
		MUESTRAS	confirmados				
<i>E. coli</i>	PASTAZA	212	180	85% (180/212)	0	83% (149/180)	
	SANTO DOMINGO	226	198	88% (198/226)	0	96% (191/198)	
<i>K. pneumoniae</i>	PASTAZA	212	198	32% (67/212)	106	19% (13/67)	
	SANTO DOMINGO	226	97	43% (97/226)	0	20% (19/97)	

Tabla 13.

Resumen de resultados según la zona y los hospederos del estudio (*E. coli*)

BASE DE DATOS <i>E. coli</i>						
ZONA	HOSPEDERO	N°	Aislados	% Prev.	Portador <i>mcr-1</i>	% Prev <i>mcr-1</i>
		MUESTRAS	confirmados			
PASTAZA	Humanos	65	58	89% (58/65)	53	91% (53/58)
	Cerdos	69	54	78% (54/69)	37	69% (37/54)
	Aves de corral	78	68	87% (68/78)	59	87% (59/68)
SANTO	Humanos	72	58	81% (58/72)	58	100% (58/58)
DOMINGO	Cerdos	78	74	95% (74/78)	69	93% (69/74)
	Aves de corral	76	66	87% (66/76)	64	97% (64/66)

Tabla 14.

Resumen de resultados según la zona y los hospederos del estudio (*K. pneumoniae*)

BASE DE DATOS <i>K. pneumoniae</i>						
ZONA	HOSPEDERO	N° MUESTRAS	Aislados confirmados	% Prev.	Portador <i>mcr-1</i>	% Prev <i>mcr-1</i>
PASTAZA	Humanos	65	39	60% (39/65)	10	26% (10/39)
	Cerdos	69	5	7% (5/69)	0	0% (0/5)
	Aves de corral	78	23	29% (23/78)	3	13% (3/23)
SANTO DOMINGO	Humanos	72	60	83% (60/72)	11	18% (11/60)
	Cerdos	78	17	22% (17/78)	4	24% (4/17)
	Aves de corral	76	20	26% (20/76)	4	20% (4/20)

