



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA**

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Análisis genómico de *Escherichia coli* portadoras de genes de resistencia *mcr-I* y *bla_{OXA-48}* de origen ambiental ecuatoriano utilizando secuenciación de tercera generación

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, para obtener el título de Ingenieras Biotecnólogas, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Este estudio forma parte del fellowship “Bacterial genomics using Oxford Nanopore Sequencing” financiado por el Programa de Biotecnología para América Latina y el Caribe (UNU Biolac); y como parte del Proyecto de Investigación “Aplicación de Tecnologías de Secuenciación de Nueva Generación (NGS) en el Análisis de Contaminación Microbiana en Cuerpos Hídricos y en la Evaluación de Patógenos de Alta Prioridad”, aprobado mediante Resolución Nro. UTA-CONIN-2023-0294-R, por el Consejo de Investigación e Innovación de la Universidad Técnica de Ambato.

Autoras: Vivian Arlette Jaramillo Mariño

Keyla Monserrath Villacís López

Tutor: PhD. William Ricardo Calero Cáceres

Ambato - Ecuador

Febrero - 2024

APROBACIÓN DE TUTOR

PhD. William Ricardo Calero Cáceres

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, opción Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Titulación y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 15 de enero del 2024

PhD. William Ricardo Calero Cáceres

C.I. 1714344885-9

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotras, Jaramillo Mariño Vivian Arlette y Villacís López Keyla Monserrath, manifestamos que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingenieras Biotecnólogas, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Jaramillo Mariño Vivian Arlette

C.I. 1850084805

Autor



Villacís López Keyla Monserrath

C.I. 0502887508

Autor

DERECHOS DE AUTOR

Autorizamos a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final del Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y proceso de investigación según las normas de la Institución.

Cedemos los Derechos en línea patrimoniales de nuestro Informe Final del Trabajo de Titulación, con Fines de difusión pública, además aprobamos la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando nuestros derechos de autor.



Jaramillo Mariño Vivian Arlette

C.I. 1850084805

Autor



Villacís López Keyla Monserrath

C.I. 0502887508

Autor

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, opción Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Por constancia firman:

Presidente del Tribunal

Mg. María Daniela Garcés Moncayo

1803571585

Mg. Cristian Fernando Galarza Galarza

1803160272

Ambato, 08 de febrero del 2024

DEDICATORIA

*“No conocemos un mundo en donde **está bien** si no puedes, si fallas. Sin embargo, hagamos lo más que podamos, hagamos nuestro mejor esfuerzo. Solo espero que incluso si fallamos, seremos lo suficientemente fuertes para **levantarnos de nuevo**”*

-Veinticinco, veintiuno

A Dios y a la Virgen María.

*A mi mamá **Mónica**, por el amor, paciencia, dedicación en cuidarme y por siempre creer en mí.*

*A mi papá **Rafael**, por ser mi ejemplo a seguir, ser mi compañero de risas y por todo el esfuerzo que haces por siempre darnos lo mejor.*

*A mi hermano **Alejandro**, por ser mi rayito de sol todos los días y ser la persona que me motiva a querer ser mejor.*

*A mi gatita **Chipi**, por acompañarme en cada noche de desvelo.*

-Muy agradecida con Dios por tenerles como mi familia, los amo infinito-

Jaramillo Mariño Vivian Arlette

DEDICATORIA

"One day, you'll leave this world behind

So live a life you will remember"

Avicii - The Nights

*A mi **familia**,*

*A mi mami, **María Mercedes López J.**, por ser mi inspiración, mi mayor apoyo y la
mujer más increíble en el mundo.*

*A mi papi, **José Miguel Villacís J.**, por ser mi héroe, mi ejemplo de lucha constante
y mi significado de fuerza y valentía.*

*A mi hermana mayor, **Evelin Natalí**, por ser mi cómplice, mi mejor amiga y la
persona que me regaló un motivo más para seguir adelante. A mi sobrina **Antonella
Monserrath**, mi princesa.*

*A mi hermano menor, **Joseph Steveen**, por ser mi amigo, mi apoyo, mi alegría, mi
diversión. Creo firmemente en ti y estoy segura de que puedes alcanzar todo aquello
que tu corazón desee.*

Dios los cuide y los proteja siempre.

Los amo con todo mi corazón.

Villacís López Keyla Monserrath

AGRADECIMIENTO

*Agradezco a **Dios** por guiarme, cuidarme en cada paso que doy y permitirme haber vivido una de las etapas más bonitas junto a gente maravillosa.*

*A mi **mami** por ser quien siempre me ha acompañado durante cada paso que doy desde muy chiquita, gracias por cuidarme y ayudarme siempre. Gracias por ser la mejor mamá del mundo. En la próxima vida te volveré a escoger como mi mamá.*

*A mi **papá** por siempre estar pendiente de mí. Gracias por ser mi sustento y apoyo siempre. Gracias por tus anécdotas que, aunque nos las sepamos de memoria nos alegras los días.*

*Agradezco a mi **hermano**, mi cachorro, gracias por hacerme reír y molestarme siempre. Espero que todo lo bonito de la vida te pase y poder vivir contigo cada uno de los logros y metas que alcances.*

*Agradezco a mis **abuelitos** por su amor, palabras de cariño y aliento. A mis **tíos** por siempre apoyarme y ayudarme.*

*Agradezco a mi amiga **Key**, gracias por tu paciencia, apoyo, por las risas y por todos los momentos que compartimos juntas. Que Dios te Bendiga siempre y que logres todos tus sueños. Te quiero. Gracias por haber compartido este pedacito de tu vida conmigo.*

*A mi chiquita, **Jona**, gracias por tantos años de amistad, por tu paciencia y ayuda durante este camino. Que la vida nos permita seguir siendo amigos por siempre. A **Andre** por hacerme reír con sus locuras y por su amor infinito, te quiero. A **Ali**, gracias por aparecer en mi vida. A mis hermanas de otros papás, **Monse**, **Sandy** y **Dany** por ser mi apoyo siempre, las llevo en mi corazón.*

*A mi tutor, **PhD. William Calero** por recibirme con cariño para ser parte de su equipo, por el tiempo y conocimientos impartidos. Gracias.*

Jaramillo Mariño Vivian Arlette

AGRADECIMIENTO

“No es magia, es ciencia”

*Agradezco a **Dios** por su bendición, por guiarme y darme la fortaleza para seguir adelante cumpliendo mis sueños.*

*A mis **padres**, por su amor infinito, esfuerzo y dedicación, porque gracias a ellos soy la mujer que soy. A mis **hermanos**, por su complicidad, motivación y felicidad. A mi **sobrina**, por su ternura e inocencia que me inspira a ser mejor cada día. A **Henry**, por ser un apoyo fundamental en esta etapa tan importante en mi vida, por su amor y su tiempo. A mis **abuelitos**, por ser un apoyo incondicional, por su cálido cariño y por ser mis segundos padres, con quienes puedo contar siempre.*

*A mi tutor, **PhD. William Ricardo Calero Cáceres**, por su enseñanza, paciencia, sabiduría y consejos durante esta maravillosa etapa. Muchas gracias eternamente a toda la familia UTA RAM – One Health.*

*A mi amiga y compañera de tesis, **Vivi**, gracias por el esfuerzo, la energía y la euforia que representó este momento intenso en nuestras vidas durante toda la ejecución de esta investigación. A **Andre Vallejo**. y a **Luis Zhu**, por su amistad y por ser lo más bonito que me recordará esta etapa. A mis amigos y compañeros de clase, por los momentos inolvidables, por las risas y la travesía.*

Dios los bendiga siempre.

Los quiero mucho.

Villacís López Keyla Monserrath

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

APROBACIÓN DE TUTOR.....	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	iii
DERECHOS DE AUTOR	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	v
DEDICATORIA.....	vi
DEDICATORIA.....	vii
AGRADECIMIENTO	viii
AGRADECIMIENTO	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
ÍNDICE DE TABLAS.....	xvi
ÍNDICE DE ANEXOS	xvii
RESUMEN EJECUTIVO	xix
ABSTRACT	xx
CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO	1
1.1. Antecedentes Investigativos.....	1
1.1.1. Desarrollo e historia de los antibióticos	1
1.1.2. Clasificación de los antibióticos.....	3
1.1.2.1. Según su origen	3
1.1.2.2. Según su estructura química.....	5
1.1.2.3. Según el mecanismo de acción y de resistencia	5
1.1.2.4. Según su efecto farmacológico.....	6
1.1.2.5. Según su espectro de actividad.....	7

1.1.3.	Uso de los antibióticos.....	7
1.1.4.	Resistencia Antimicrobiana (RAM)	9
1.1.4.1.	Resistencia a Colistina.....	11
1.1.4.2.	Resistencia a Carbapenémicos	13
1.1.5.	Mecanismo de resistencia de <i>E. coli</i>	14
1.1.6.	Genes de resistencia a antibióticos de último recurso (LARGs).....	15
1.1.7.	Resistencia a Antibióticos en el contexto medioambiental	17
1.1.8.	Tecnología De Secuenciación De Próxima Generación.....	19
1.1.8.1.	Secuenciación del Genoma Completo (WGS)	19
1.1.8.2.	Oxford Nanopore Sequencing	19
1.1.8.3.	Beneficios Y Limitaciones de ONT	21
1.1.9.	Herramientas Bioinformáticas.....	21
1.1.9.1.	Galaxy Project	22
1.1.9.2.	Proksee Genome Analysis.....	22
1.1.9.3.	PlasmidFinder.....	22
1.1.9.4.	ResFinder.....	23
1.1.9.5.	DiGAlign	23
1.1.9.6.	iTOL	23
1.2.	Objetivos	24
1.2.1.	Objetivo General	24
1.2.2.	Objetivos Específicos.....	24
2.	CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA.....	25
2.1.	Materiales.....	25
2.2.	Métodos.....	29

2.2.1.	Obtención de secuencias de genoma completo de <i>E. coli</i> portadoras de genes de resistencia <i>mcr-1</i> y <i>bla</i> _{OXA-48} de origen ambiental de Ecuador utilizando secuenciación de tercera generación	29
2.2.1.1.	Generación de biomasa de los aislamientos	29
2.2.1.2.	Extracción de ADN del <i>E. coli</i> mediante Genomic DNA Mini Kit .	30
2.2.1.3.	Secuenciación del genoma completo de <i>E. coli</i> usando ONT	30
2.2.1.4.	Evaluación de la calidad de las secuencias genómicas	31
2.2.1.5.	Caracterización de secuencias de <i>E. coli</i> mediante CGE	31
2.2.1.6.	Ensamblado y pulido de secuencias de <i>mcr-1</i> y <i>bla</i> _{OXA-48}	32
2.2.2.	Examinación del entorno genético de los genes <i>mcr-1</i> y <i>bla</i> _{OXA-48} en las secuencias de genoma completo de las cepas de <i>E. coli</i> analizadas	33
2.2.2.1.	Examinación del entorno genético mediante DiGAlign.....	33
2.2.3.	Evaluación filogenética de secuencias de genoma completo de cepas de <i>E. coli</i> de aislamientos de diferentes orígenes.....	33
2.2.3.1.	Descarga de secuencias del genoma completo de diferente origen mediante el NCBI	33
2.2.3.2.	Evaluación de la presencia de genes de resistencia a antibióticos y virulencia mediante BacWSTdb.	34
2.2.3.3.	Elaboración del árbol filogenético mediante Galaxy Sciensano con la herramienta cgMLST.....	34
2.2.3.4.	Visualización y anotación de árbol filogenético mediante iTOL	35
3.	CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
3.1.	Análisis y discusión de los resultados.....	36
3.1.1.	Análisis de secuencias mediante de herramientas bioinformáticas	36
3.1.1.1.	Análisis de secuencias de genoma completo.....	36

3.1.1.2.	Caracterización de secuencias de genoma completo (WGS) de <i>E. coli</i> portadores de gen <i>mcr-1</i> y <i>bla_{OXA-48}</i> utilizando secuenciación de tercera generación.....	40
3.1.1.3.	Examinación del entorno genético de los genes <i>mcr-1</i> y <i>bla_{OXA-48}</i> en las secuencias de genoma completo de las cepas de <i>E. coli</i> analizadas.....	49
3.1.1.4.	Evaluación de la filogenia de secuencias de genoma completo de cepas de <i>E. coli</i> de aislamiento de diferentes orígenes	57
4.	CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	71
4.1.	Conclusiones	71
4.2.	Recomendaciones.....	73
C.	MATERIALES DE REFERENCIA.....	74
	Referencias Bibliográficas	74
	Anexos.....	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Representación de los principales mecanismos de acción y de resistencia..	6
Figura 2 Diseminación de antibióticos.....	9
Figura 3 Fundamento de Oxford Nanopore Technologies.....	20
Figura 4 Mapa circular de la secuencia genómica completa de la cepa de <i>E. coli</i> 62A aislada del Río Cutuchi	46
Figura 5 Mapa circular de la secuencia genómica completa de la cepa de <i>E. coli</i> 17A aislada del Canal L-S-A.	48
Figura 6 Entorno Genético de la cepa <i>E. coli</i> 62A con el gen <i>mcr-1</i>	51
Figura 7 Entorno Genético de la cepa <i>E. coli</i> 17A con el gen <i>bla</i> _{OXA-48}	55
Figura 8 Mapa circular de MLST de la secuencia genómica completa de la cepa de <i>E. coli</i> 62A aislada del Río Cutuchi	58
Figura 9 Mapa circular de MLST de la secuencia genómica completa de la cepa de <i>E. coli</i> 17A aislada del Canal L-S-A	60
Figura 10 Árbol filogenético rectangular con de genes de resistencia para 57 aislamientos de <i>E. coli</i> de diverso origen en comparación con la WGS de la cepa 62A	64
Figura 11 Árbol filogenético rectangular con de genes de resistencia para 57 aislamientos de <i>E. coli</i> de diverso origen en comparación con la WGS de la cepa 62A. Parte II.....	65
Figura 12 Árbol filogenético rectangular con de genes de resistencia para 149 aislamientos de <i>E. coli</i> de diverso origen geográfico en comparación con la WGS de la cepa 17A. Parte I.....	68

Figura 13 Árbol filogenético rectangular con de genes de resistencia para 149 aislamientos de <i>E. coli</i> de diverso origen geográfico en comparación con la WGS de la cepa 17A. Parte II.....	69
Figura 14 Árbol filogenético rectangular con de genes de resistencia para 149 aislamientos de <i>E. coli</i> de diverso origen geográfico en comparación con la WGS de la cepa 17A. Parte III	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Antibióticos de origen natural y su microorganismo	4
Tabla 2 Listado de patógenos prioritarios de acuerdo a su prioridad.....	10
Tabla 3 Materiales utilizados en la ejecución del proyecto de investigación	25
Tabla 4 Recursos informáticos.....	28
Tabla 5 Determinación de las secuenciaciones del genoma completo de 2 cepas de <i>E. coli</i> de origen ambiental de Ecuador portadoras de genes de resistencia <i>mcr-1</i> y <i>bla</i> _{OXA-48}	37
Tabla 6 Caracterización basada en WGS de la cepa <i>E. coli</i> 62A aisladas de origen ambiental de Ecuador portadoras de genes de resistencia <i>mcr-1</i>	42
Tabla 7 Caracterización basada en WGS de la cepa <i>E. coli</i> 17A aisladas de origen ambiental de Ecuador portadoras de genes de resistencia <i>bla</i> _{OXA-48}	43

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Comparación del número de lecturas N50 de la cepa <i>E. coli</i> 62A (barcode 19)	104
Anexo 2 Comparación del número de lecturas N50 de la cepa <i>E. coli</i> 17A (barcode 09)	105
Anexo 3 Comparación del número de lecturas de la cepa <i>E. coli</i> 62A (barcode 19)	106
Anexo 4 Comparación del número de lecturas de la cepa <i>E. coli</i> 17A (barcode 09)	107
Anexo 5 MLST de Atchman de la cepa <i>E. coli</i> 17A	108
Anexo 6 MLST de Pasteur de la cepa de <i>E. coli</i> 17A.....	108
Anexo 7 MLST de Atchman de la cepa de <i>E. coli</i> 62A.....	109
Anexo 8 MLST de Pasteur de la cepa de <i>E. coli</i> 62A.....	110
Anexo 9 Árbol filogenético rectangular con de genes de virulencia para 57 aislamientos de <i>E. coli</i> de diverso origen en comparación con la WGS de la cepa 62A. Parte I.	111
Anexo 10 Árbol filogenético rectangular con genes de virulencia para 57 aislamientos de <i>E. coli</i> de diverso origen en comparación con la WGS de la cepa 62A. Parte II	112
Anexo 11 Árbol filogenético rectangular con genes de virulencia para 57 aislamientos de <i>E. coli</i> de diverso origen en comparación con la WGS de la cepa 62A. Parte I .	113
Anexo 12 Árbol filogenético rectangular con de genes de virulencia para 149 aislamientos de <i>E. coli</i> de diverso origen en comparación con la WGS de la cepa 17A. Parte II.....	114

Anexo 13 Árbol filogenético rectangular con de genes de virulencia para 149 aislamientos de <i>E. coli</i> de diverso origen en comparación con la WGS de la cepa 17A. Parte III.....	115
Anexo 14 BLAST de una región de la cepa <i>E. coli</i> 62A	116
Anexo 15 Mapa Geográfico con los 150 aislamientos del gen <i>bla</i> _{OXA-48}	117
Anexo 16 Gráfica de los 150 aislamientos vs los años de colección del gen <i>bla</i> _{OXA-48}	118
Anexo 17 Aislamientos de <i>E. coli</i> con el gen <i>mcr-1</i> de diferente origen y años de colección en Ecuador	119
Anexo 18 Aislamientos de <i>E. coli</i> con el gen <i>bla</i> _{OXA-48} de diferente origen y ubicación geográfica a nivel mundial	121

RESUMEN EJECUTIVO

La presente investigación enfatiza la importancia del análisis de la resistencia antimicrobiana (RAM) tanto a nivel mundial como en Ecuador, centrándose en el análisis de dos secuencias de genoma completo de cepas de *E. coli* (62A y 17A) de origen ambiental, las cuales albergan genes de resistencia. La relevancia de este trabajo en la salud pública global es significativa, resaltando la urgencia de abordar esta problemática.

Mediante la técnica de secuenciación Oxford Nanopore Technologies (ONT) y el uso de herramientas bioinformáticas, se logró una caracterización detallada de los cromosomas y plásmidos de las cepas. El análisis se llevó a cabo en la plataforma del Centro de Epidemiología Genómica (CGE-DTU), permitiendo identificar genes de resistencia, virulencia, plásmidos, tipos de secuencia, incluyendo la tipificación de secuencias multilocus (MLST). Además, se estudió el entorno genético mediante DiGAling y la filogenia a través del método cgMLST de la plataforma Galaxy, usando la herramienta iTOL para su visualización.

Los resultados revelaron que ambas cepas tienen un tamaño genómico aproximado de 4.8 Mb, y los genes de resistencia se localizaron en plásmidos tipo IncFII. También, comparten perfiles filogenéticos y resistencia a antibióticos, destacando particularmente a la cepa *E. coli* 17A, siendo la primera en Ecuador reportada con el gen *bla*_{OXA-48}. Estos descubrimientos son vitales para la vigilancia y control de *E. coli*. Resaltando la importancia de un enfoque integrador de One Health, que considera la relación entre la salud humana, animal y ambiental; permitiendo crear estrategias coordinadas contra los desafíos de la resistencia a los antibióticos.

Palabras clave: Biotecnología ambiental, bioinformática, análisis genómico, RAM, resistencia a colistina, resistencia a antibióticos, secuenciación de genoma completo (WGS), *mcr-1*, LARGs, *bla*_{OXA-48}, *Escherichia coli*

ABSTRACT

The present research emphasizes the importance of analyzing antimicrobial resistance (AMR) both globally and in Ecuador, focusing on the analysis of two complete genome sequences of *E. coli* strains (62A and 17A) of environmental origin, which harbor resistance genes. The relevance of this work in global public health is significant, highlighting the urgency to address this issue.

Using the Oxford Nanopore Technologies (ONT) sequencing technique and bioinformatics tools, a detailed characterization of the chromosomes and plasmids of the strains was achieved. The analysis was carried out on the platform of the Center for Genomic Epidemiology (CGE-DTU), allowing the identification of resistance genes, virulence factors, plasmids, sequence types, including multilocus sequence typing (MLST). Additionally, the genetic environment was studied using DiGAling and phylogeny through the cgMLST method of the Galaxy platform, using the iTOL tool for visualization.

The results revealed that both strains have an approximate genomic size of 4.8 Mb, and the resistance genes are located on IncFII type plasmids. They also share phylogenetic profiles and antibiotic resistance, particularly highlighting the *E. coli* 17A strain, being the first in Ecuador reported with the *bla*_{OXA-48} gene. These discoveries are vital for the surveillance and control of *E. coli*, underscoring the importance of an integrated One Health approach, which considers the relationship between human, animal, and environmental health; allowing for coordinated strategies against the challenges of antibiotic resistance.

Key words: Environmental biotechnology, bioinformatics, genomic analysis, AMR, colistin resistance, antibiotic resistance, whole genome sequencing (WGS), *mcr-1*, LARGs, *bla*_{OXA-48}, *Escherichia coli*.

CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

1.1.1. Desarrollo e historia de los antibióticos

La primera utilización del término “*antibiótico*” fue en 1941 por Selman Waksman, para denominar a cualquier molécula producida por un microorganismo durante su metabolismo, que elimina o inhibe el crecimiento de otro microorganismo sin ser tóxico para el hospedador (**Uddin et al., 2021**). En 1877, Louis Pasteur y J. L. Joubert describieron la competencia entre los microorganismos y propusieron que se realizara investigaciones adicionales para explorar sus usos (**Cavaillon & Legout, 2022**). No obstante, en 1889, el microbiólogo francés Jean Paul Vuillemin ya había creado el término “*antibiosis*” para referirse al efecto antagónico en el crecimiento de dos microorganismos (**Dhingra et al., 2020**).

En la antigüedad, los efectos de los antibióticos eran conocidos de manera empírica desde 1.500 años a. C. por los médicos chinos (**Zhou, 2023**). Quienes registraron en sus escritos el uso de vendajes impregnados con una sustancia similar a un "moho" para acelerar la curación de heridas infectadas y forúnculos; pacientes y médicos por igual se asombraban del efecto casi milagroso de estos, en infecciones bacterianas graves (**Johnson, 2021**). En 1893, el primer antibiótico en forma de cristal puro duro y espumoso fue el ácido micofenólico, aislado por un médico y microbiólogo italiano, el Dr. Bartolomeo Gosio, a partir de *Penicillium glaucum* (más tarde conocido como *P. brevicompactum*), que inhibía el crecimiento de los bacilos del ántrax (**Dhingra et al., 2020**). Sin embargo, en 1939, René Dubos descubrió la gramicidina, el primer antibiótico probado clínicamente (**Durand et al., 2019**).

A mediados del siglo XX, el descubrimiento de antibióticos consistía normalmente en cribar cultivos de organismos derivados del suelo, como los estreptomicetos, para

comprobar su actividad contra otros microorganismos **(Quinn et al., 2020)**. Por lo que, el enfoque de cribado sistemático introducido por Paul Ehrlich, marcó el inicio de las estrategias para la exploración de medicamentos a partir de lo cual se desarrollaron múltiples antibióticos nuevos con mayor actividad y potencia **(Acharya & Kurosu, 2023)**.

Este enfoque condujo al descubrimiento de las sulfamidas, concretamente la sulfonamidocrioidina (KI-730, Prontosil), que fue sintetizada por los químicos de Bayer Josef Klarer y Fritz Mietzsch y probada por Gerhard Domagk para determinar su actividad antibacteriana en una serie de enfermedades **(Deuber et al., 2021)**. Mientras Domagk trabajaba en tinciones en la I. G. Farbenindustrie, descubrió que la sulfonamidocrisoidina y el prontosil rojo, si se inyectaba en ratones a los que previamente se les había administrados dosis letales de *Streptococcus* spp., les permitía sobrevivir con pocos o ningún efecto secundario perjudicial **(Pai, 2021)**. Pues, en 1935, cuando su hija se infectó con una cepa virulenta de *Streptococcus* spp., le administró prontosil a dosis basadas en sus resultados *in vitro*, la niña se recuperó y la noticia causó sensación en todo el mundo **(Vanmeter & Hubert, 2023)**. El prontosil parecía ser un precursor del fármaco activo, por lo que su parte activa, la sulfanilamida, no era patentable, ya que se utilizaba en la industria de los tintes hace algunos años **(Paskins, 2021)**.

Por su parte, en 1929, Alexander Fleming, médico inglés y profesor de bacteriología del Saint Mary, en Londres, observó que una colonia de estafilococos de un cultivo era destruida al contaminarse accidentalmente con un hongo (*Penicillium notatum*) **(Kaderabkova et al., 2022)**. En base a ello, H. W. Florey, E.B. Chain, y su equipo de investigadores en Oxford, desarrollaron la técnica que les permitió producir el extracto purificado para el empleo clínico de la penicilina **(Bruner et al., 2023)**. Los resultados de sus primeros trabajos se publicaron en 1940, lo que generó interés en el campo y promovió el trabajo sobre otros antibióticos que podrían ser útiles en los casos en los que la penicilina no lo fuera **(Andersson et al., 2021)**.

Los años cincuenta fueron otro periodo de grandes avances farmacológicos, en el que nació la quimioterapia antitumoral; se introdujeron nuevos antimicrobianos, como la 6-mercaptopurina, el busulfato, entre otros **(Hua et al., 2022)**. Por lo tanto, el uso de

la penicilina y las sulfonamidas señalo el comienzo de la “*edad de oro*” del descubrimiento de los productos antibióticos naturales; una nueva era en la gestión de la salud y las enfermedades humanas, y con ella, el problema de la resistencia a los antibióticos (**Hutchings *et al.*, 2019**).

1.1.2. Clasificación de los antibióticos

Los antibióticos pueden clasificarse principalmente en varios grupos, los cuales corresponden a su origen, estructura química, mecanismo de acción y de resistencia bacteriana, según su efecto farmacológico y espectro de actividad (**Pancu *et al.*, 2021**).

1.1.2.1. Según su origen

De acuerdo a su origen se clasifican tanto en compuestos naturales, semisintéticos y sintéticos (**Pancu *et al.*, 2021**).

- ***Antibióticos naturales***

Los antibióticos naturales son aquellos provenientes de microorganismos, entre algunos de los ejemplos se encuentran los presentados en la **Tabla 1**.

Tabla 1

Antibióticos de origen natural y su microorganismo

Antibiótico	Microorganismo
Penicilina	<i>Penicillium notatum</i>
Tirotricina	<i>Bacillus brevis</i>
Vancomicina	<i>Streptomyces orientalis</i>
Gentamicina	<i>Micromonospora purpure</i>

Nota. En la tabla se presenta algunos de los ejemplos de antibióticos de origen natural con su respectivo microorganismo de origen. Hutchings *et al.*, (2019, p. 75).

- ***Antibióticos semisintéticos y sintéticos***

Por otro lado, los antibióticos semisintéticos son aquellos provenientes de microorganismos estructuralmente modificados; presentan ventajas en cuanto a una mejor eficacia, menor toxicidad y amplio espectro de actividad bactericida, en comparación con los antibióticos de origen natural (Pan et al., 2022). Entre algunos de los antibióticos semisintéticos se encuentran: daptomicina, tigeciclina, dalbavancina y telavancina, oritavacina, entre otros (Van Groesen *et al.*, 2022). En cuanto a los antibióticos sintéticos son aquellos obtenidos en laboratorio mediante síntesis química, como lo son la iboxamicina, isoniazida, pirazinamida, etambutol, entre otros (Lewis, 2020).

1.1.2.2. Según su estructura química

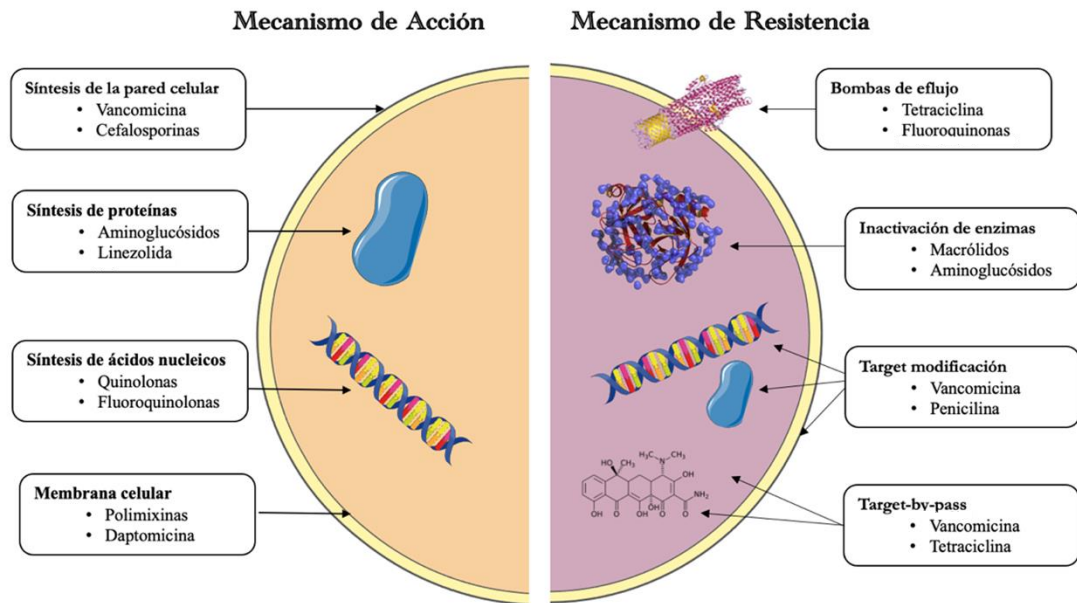
Se clasifican en siete grupos (β –lactámicos, tetraciclinas, macrólidos, sulfonamidas, quinolonas, aminoglucósidos y glucopéptidos) (**Reis *et al.*, 2020**).

1.1.2.3. Según el mecanismo de acción y de resistencia

Entre los principales mecanismos se encuentra la síntesis de proteínas, de la pared celular, la desintegración de la membrana celular y la síntesis de ácidos nucleicos (**O'Rourke *et al.*, 2020**). Respecto a los mecanismos de resistencia, se menciona que las bacterias han ido desarrollado cuatro tipos, entre ellas las bombas de eflujo, la inactivación de antibióticos, derivación de la diana y la modificación de la diana (**Uluseker *et al.*, 2021**) (ver **Figura 1**).

Figura 1

Representación de los principales mecanismos de acción y de resistencia



Nota. Adaptado de “A review on Occurrence and Spread of Antibiotic Resistance in Wastewaters and in Wastewaters Treatment Plants: Mechanisms and Perspectives” (p.4) por Uluseker *et al.*, 2021, *Frontiers*.

1.1.2.4. Según su efecto farmacológico

De acuerdo a su efecto farmacológico pueden ser bactericidas, es decir antibióticos que provocan la lisis de las células bacterianas mediante la obstrucción de la síntesis de la pared celular o inhibiendo la función de la membrana celular, tal es el caso de los β -lactámicos; mientras que el fundamento de los antibióticos bacteriostáticos se basa en inhibir el crecimiento de las células bacterianas, sin generar la muerte de las mismas, como por ejemplo las tetraciclinas (Baquero & Levin, 2021; Patil & Patel, 2021).

1.1.2.5. Según su espectro de actividad

Existen dos tipos de subclasificación. Los de amplio espectro son aquellos que muestran eficacia contra un amplio rango de bacterias, es decir tanto a Gram-positivas como las Gram-negativas. Mientras que los de estrecho espectro, se enfocan en un solo tipo de bacterias, ya sean Gram-positivas o solo Gram-negativas (**Pancu et al., 2021**).

1.1.3. Uso de los antibióticos

Los antibióticos son elementos fundamentales para el progreso de la medicina moderna, y resulta desafiante concebir el desarrollo continuo de los logros recientes en este campo sin su presencia (**Miethke et al., 2021**). Por lo que, desarrollar antibióticos inéditos en el siglo XXI ha representado un desafío de dimensiones significativas (**Dutescu & Hillie, 2021**). Los antibióticos se han establecido como uno de los métodos más exitosos para el manejo y control de enfermedades infecciosas (**Chinemerem et al., 2022**). No obstante, en los últimos 60 años estos fármacos han tenido una gran influencia y rápida implementación en los sectores veterinario y agrícola, debido a la demostrada eficacia como promotores de crecimiento y en la optimización del rendimiento de la alimentación animal (**Callaway et al., 2021**).

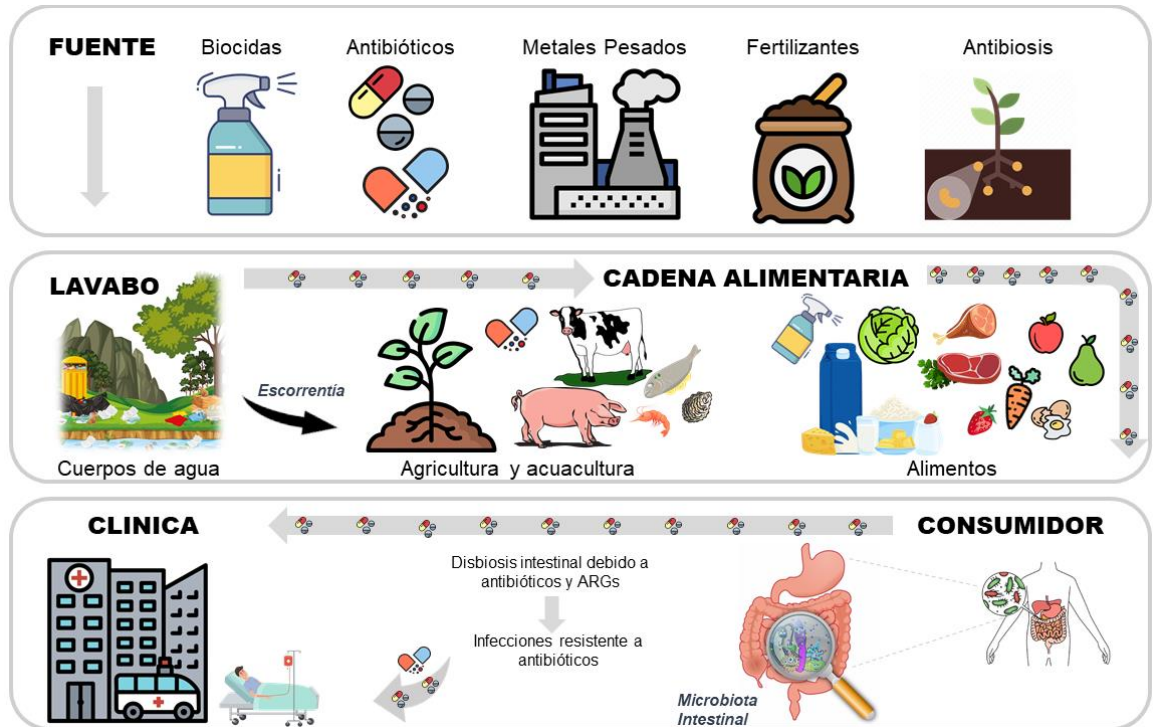
Los antibióticos se utilizan cada vez más en todo el mundo en diferentes industrias (**Waters et al., 2022**). Por ejemplo, alrededor de dos tercios de los antimicrobianos producidos en el mundo se utilizan en animales destinados a la alimentación; se calcula que en el año 2010 fueron 63,151 toneladas y se espera que aumenten hasta 105,596 toneladas para el año 2030, debido a que la mayoría de los animales se crían de forma intensiva (**Alhaji et al., 2023**). En América del Sur, la compra de antibióticos no requiere receta, resultando en que aproximadamente el 78% de los antibióticos en Latinoamérica se venden sin prescripción médica (**Auta et al., 2019**).

En el 2010, Ecuador reportó el primer caso de resistencia a los antimicrobianos, identificado en una cepa de *Klebsiella pneumoniae* que produce carbapenemasas; esta enzima, generada por dicha bacteria, impide la efectividad de los antibióticos carbapenémicos (**Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2018; Romero et al., 2022**). En este contexto, hasta 2017, el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) ha sido la única institución que ha realizado seguimiento a la resistencia bacteriana. Según su informe del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos, se han observado tasas preocupantes de resistencia en *E. coli* en infecciones urinarias comunitarias, con índices de resistencia a la ampicilina entre el 70.4 y el 87.2%. (**Ross et al., 2020**).

En Ecuador, no se registran cifras actuales sobre resistencia a los antibióticos; sin embargo, el empleo y la sobreutilización de estos agentes antibacterianos han llevado a su vez a un incremento en las resistencias de los microorganismos (**Dadgostar, 2019**). Por lo que, investigadores analizan también los principales focos de diseminación, ya que la liberación de antibióticos al medio ambiente y las consecuencias de la presencia de residuos antimicrobianos persistentes en los ecosistemas han sido objeto de numerosos estudios en todas las partes del mundo (**Romero et al., 2022**). Los cuales incluyen algunos entornos naturales, como los alrededores de las plantas farmacéuticas, las granjas y acuiculturas de animales; así como también los que reciben aguas residuales hospitalarias tratadas están constantemente expuestos a contaminantes que contienen antibióticos, lo que provoca la persistencia de concentraciones variables de antimicrobianos (ver **Figura 2**) (**Serwecińska, 2020**).

Figura 2

Diseminación de antibióticos



Nota. Adaptado de “Environmental Spread of Antibiotic Resistance” (p. 2), por Skandalis et al., 2021, *Antibiotics*, 10(640).

1.1.4. Resistencia Antimicrobiana (RAM)

La resistencia antimicrobiana (RAM) ha surgido como una de las amenazas más severas y alarmantes para la salud pública a nivel mundial (**WHO, 2019b**). Debido a que, conlleva a un aumento en el índice de morbilidad, mortalidad y mayor costo en atención médica en el sistema de salud a nivel mundial (**Undurraga et al., 2023**). De acuerdo con el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP), en 2019 se ha reportado 1.27 millones de muertes correspondientes a infecciones por resistencia a antibióticos (**Bastidas et al., 2023**). Y se estima que para el año 2050 se alcanzará una tasa de alrededor de 10 millones de muertes (**WHO, 2019c**).

Desafortunadamente, como resultado del empleo irresponsable de antibióticos tanto en prácticas del sector agrícola, humano, zootecnista y de otras fuentes antropogénicas, como efluentes de hospitales e industriales han contribuido en la diseminación de este tipo de medicamentos en el medio ambiente (**Zahra et al., 2023**). Convirtiéndose en las causas para el aumento de bacterias resistentes a los antibióticos (ARBs, del inglés *antibiotic-resistance bacterias*) y por ende la proliferación de sus genes de resistencia a los antibióticos (ARGs, del inglés *antibiotic-resistance genes*) (**Bobate et al., 2023**).

Por lo que, la Organización Mundial de la Salud (OMS) emitió una lista de patógenos prioritarios, es decir bacterias resistentes a una amplia variedad de antibióticos, con la finalidad de impulsar la investigación y creación de nuevos antibióticos en respuesta a las necesidades actuales de la salud pública (**Asokan et al., 2019**). La lista se encuentra clasificada en prioridad crítica, alta y media correspondiente a la necesidad del desarrollo de nuevos antibióticos (**Tacconelli et al., 2018**) (ver **Tabla 2**).

Tabla 2

Listado de patógenos prioritarios de acuerdo a su prioridad

Prioridad	Microorganismo	Resistencia
Crítica (I)	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenem
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenémicos
	<i>Enterobacteriaceae</i>	Carbapenémicos
Alta (II)	<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Meticilina

Prioridad	Microorganismo	Resistencia
	<i>Helicobacter pylori</i>	Claritromicina
	<i>Campylobacter</i> spp. & <i>Salmonellae</i>	Fluoroquinolonas
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cefalosporinas
Media (III)	<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicilina
	<i>Shigella</i> spp.	Fluoroquinolonas

Nota. Asokan *et al.*, (2019, p. 187).

Por tanto, la OMS se ha encargado de adoptar estrategias para contener la evolución acelerada de microorganismos resistentes y evitar el desarrollo de nuevos mecanismos de resistencia. El desarrollo de un listado de compuestos antimicrobianos considerados de “Alta prioridad” el cual incluye a las cefalosporinas de amplio espectro, glicopéptidos, quinolonas, polimixinas, macrólidos, carbapenémicos, entre otros, con la finalidad de restringir su uso (Nang *et al.*, 2019).

1.1.4.1. Resistencia a Colistina

La colistina es un antibiótico polipeptídico que pertenece a la familia de las polimixinas, el cual en los últimos años ha generado gran interés en el mundo, debido a la creciente prevalencia de bacterias Gram-negativas multirresistentes (MDR-GNB, del inglés *Multidrug-resistant Gram-negative bacteria*) (Abavisani *et al.*, 2023). Esto

se debe a que tiene un espectro de actividad contra la familia de las *Enterobacteriaceae*, entre ellas *E. coli*, especies de *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Shigella* y de *Salmonella* (**Gogry et al., 2021**).

De acuerdo al listado “Antimicrobianos de importancia crítica para la salud de la OMS” se ha categorizado a la colistina dentro del grupo de prioridad crítica con factor 3; es decir, es una clase de antimicrobiano utilizado para el tratamiento de personas que mantienen un expediente médico de pruebas extensas de transmisión de bacterias resistentes o de genes de resistencia, ya que es una opción terapéutica de último recurso para infecciones graves, especialmente para *Enterobacterales* que son resistentes a carbapenemasas (**WHO, 2019a**). La evolución de la resistencia a la colistina mediado por plásmidos es proveniente de genes móviles (*mcr*, del inglés *mobile colistine resistance*) en *E. coli*, esto debido al uso inapropiado de este antibiótico como promotor de crecimiento en pollos y cerdos; provocando una rápida notificación de genes *mcr* en cepas de *E. coli* en diferentes fuentes, tanto humanas, ambientales y agrícolas (**Bastidas et al., 2023**).

En cuanto a la resistencia adquirida en las *Enterobacteriaceae* se puede dar mediante diferentes mecanismos, entre ellos se encuentra modulación cromosómica, bombas de eflujo (**Gogry et al., 2021**). Sin embargo, la mutación en los genes de síntesis de liposacáridos es uno de los mecanismos más comunes, ya que los genes *mcr-1* transfieren fosfoetanolamina (pEtN) al lípido-A en la membrana celular logrando una disminución en la carga de la superficie celular, y por tanto una menor afinidad de unión de la colistina a su sitio diana, por lo que gracias a esta modificación en la membrana se genera un mecanismo de resistencia contra los péptidos antimicrobianos (AMPs, del inglés *Antimicrobial peptides*) (**Jangir et al., 2022**).

Finalmente, la amplia distribución de genes *mcr* en cepas de *E. coli* representa una amenaza para la salud pública alrededor del mundo. Por tanto, se requiere de una alta vigilancia y estudio a la colistina mediada por *mcr-1*, que permita conocer la dinámica del plásmido en un periodo largo de tiempo (**Jiang et al., 2020**).

1.1.4.2. Resistencia a Carbapenémicos

Los carbapenémicos son un grupo de antibióticos de la familia de los β -lactámicos, bloqueadores de la biosíntesis de la pared celular (**Armstrong et al., 2021**). Son altamente efectivos contra infecciones Gram-negativas y Gram-positivas farmacorresistentes, ya que son considerados antibióticos de amplio espectro, lo que significa que son útiles contra una amplia gama de bacterias, incluyendo las que son resistentes a otros tipos de antibióticos (**Malchione et al., 2019**). Como tales, los carbapenémicos se reservan como antibióticos de último recurso (**Long et al., 2019**). Como se mencionó anteriormente, la OMS ha establecido un listado de microorganismos patógenos primordiales para la investigación y el desarrollo (I+D) de nuevos antibióticos, y dentro de esta lista, estos se encuentran en el grupo de prioridad 1, que se considera crítico, frente a microorganismos como *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacteriaceae* (ver **Tabla 2**) (**Terreni et al., 2021**).

Por lo que, la propagación mundial de *Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos (CRE, del inglés *carbapenem-resistant Enterobacterales*) se ha transformado en una cuestión relevante de salud pública, debido al rápido aumento de la prevalencia de genes que codifican carbapenemasas (**Yao et al., 2022**). Debido a que, la mayor parte de la resistencia a carbapenémicos es otorgada por enzimas que degradan estos antibióticos, conocidas como carbapenemasas, que se dividen en las clases A, B, C y D según la clasificación de Ambler (**Armstrong et al., 2021**).

Las carbapenemasas de categoría A (p.ej., KPC), son enzimas que se originaron inicialmente en la bacteria *K. pneumoniae* capaces de hidrolizar y desactivar los carbapenémicos, lo que lleva a la resistencia (**Boueroy et al., 2022**). Son particularmente preocupantes debido a su amplia capacidad de diseminación y su asociación con infecciones nosocomiales (**Tamma et al., 2021**). Por su parte, las carbapenemasas de clase B (p.ej., IMP, VIM, NDM), pertenecen a la familia de las metalo- β -lactamasas (MBL) (**Senchyna et al., 2019**), como la metalo- β lactamasa de Nueva Delhi (NDM-1) (**Gu et al., 2022**), o metalo- β -lactamasas (VIM) codificada por el integrón de Verona, las cuales se caracterizan por su capacidad de unirse y desactivar

los carbapenémicos mediante la adición de iones de zinc (**Paveenkittiporn et al., 2021**).

Por su parte, la clase C, se encuentra las serinas β -lactamasas AmpC (**Ronni et al., 2022**). Por último, las enzimas carbapenemasas de la categoría D (por ejemplo, OXA-48) son miembros de la familia oxacilinasas y poseen la habilidad para hidrolizar los carbapenémicos (**CDC, 2019**). Por lo tanto, los aislados bacterianos que albergan carbapenemasas a menudo son resistentes a múltiples clases de antibióticos, lo que da como resultado opciones de terapia limitadas (**Kanj et al., 2022**).

1.1.5. Mecanismo de resistencia de *E. coli*

Las bacterias han desarrollado varios mecanismos de resistencia, como la resistencia intrínseca y extrínseca (**Mancuso et al., 2021**). La resistencia intrínseca de una bacteria frente a un antibiótico se debe a las propiedades estructurales o funcionales que poseen; una de ellas es la eliminación de antimicrobianos fuera de la célula mediante bombas de eflujo (**Jian et al., 2021**). Asimismo, se da mediante la permeabilidad de la membrana, y esto se debe a que las bacterias Gram-negativas poseen una bicapa externa hidrófoba, la cual actúan como barrera frente a los antibióticos, por lo que una alteración en la permeabilidad de la membrana externa influye en la difusión de los antimicrobianos hidrofóbicos (**Impey et al., 2020**).

Por otro lado, se presenta la resistencia adquirida a los antibióticos, la cual se alcanza por diferentes mecanismos como modificación o mutación del sitio objetivo, acción de enzimas inactivantes, cambios en la morfología celular, entre otros (**Jian et al., 2021**). La modificación o mutación se presenta cuando las bacterias son capaces de modificar las dianas antibióticas, logrando intervenir en la concentración normal y por ende interviniendo en el efecto de los antibióticos (**Zhang & Cheng, 2022**). En cuanto a la acción de enzimas inactivantes o hidrolasas se basa en la modificación de la estructura del antibiótico, logrando que lleguen al sitio objetivo con un efecto inactivante (**Egorov et al., 2018**). Los cambios en la morfología celular significa que

el mecanismo de los antibióticos se adapta a los procesos de retroalimentación mecánica entre dos factores: morfología y crecimiento celular, logrando así una alteración en la capacidad de absorción de los antibióticos (Zhang & Cheng, 2022).

1.1.6. Genes de resistencia a antibióticos de último recurso (LARGs)

Los LARGs son genes que confieren resistencia a los antibióticos considerados de último recurso, es decir, aquellos antibióticos utilizados para tratar infecciones causadas por bacterias multirresistentes (Yang *et al.*, 2022). Los LARGs pueden ser transmitidos entre bacterias de la misma especie a través de la transferencia horizontal de genes (HGT, del inglés *horizontal gene transfer*), también entre diferentes especies bacterianas (Arnold *et al.*, 2022). Por lo que, estos genes pueden encontrarse tanto en bacterias patógenas como en bacterias no patógenas que actúan como reservorios de resistencia; esto significa que los genes de resistencia pueden propagarse rápidamente, lo que contribuye a el surgimiento y propagación de bacterias con resistencia a varias categorías de antibióticos (Hassoun *et al.*, 2020).

Debido a ello, es importante conocer acerca de ciertos genes que confieren resistencia a antibióticos, en algunos casos hasta antibióticos de último recurso, como la colistina y carbapenémicos, donde, por ejemplo, se encuentran los genes *tet(X4)*, *mcr*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA}* y *bla_{KPC}* (Xiao *et al.*, 2022). Estudios revelan que, el descubrimiento de genes de β -lactamasa y carbapenemasa co-localizados con *mrc* en el mismo plásmido conjugativo es lo más preocupante (Boueroy *et al.*, 2022). Dado que, los patógenos Gram-negativos pueden adquirir ambos tipos de genes a los antibióticos por transmisión horizontal; la co-localización de estos genes con *mrc* ocurre comúnmente en los plásmidos IncHI2 y IncI2, y con menos frecuencia en IncFI e IncK2, y en los plásmidos híbridos IncX3- IncX4 (Yamamoto *et al.*, 2020).

Aun cuando, inicialmente se informó de que *mcr* era un gen de resistencia a la polimixina mediado por plásmido, *mcr-1* se ha identificado en el cromosoma de cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* (Nang *et al.*, 2019). El descubrimiento del gen *mcr-1* ha

generado alarma global debido a su resistencia a la colistina, un antibiótico considerado como una última línea de defensa contra infecciones mortales causadas por bacterias Gram-negativas resistentes a múltiples fármacos, incluyendo a la familia de las *Enterobacteriaceae* (Lei et al., 2020). Actualmente, a nivel mundial se ha identificado diez variantes del gen *mcr* que van desde el *mcr-1* a *mcr-10*, en bacterias provenientes de varias fuentes, incluyendo humanos, animales, alimentos, agrícolas y del ambiente (Hussein et al., 2021). Sin embargo, se desconocen en gran medida los posibles mecanismos de transmisión del gen *mcr* entre aislados de distintos orígenes y fuentes geográficas (Calero et al., 2023).

Asimismo, los antibióticos β -lactámicos, como las penicilinas, las cefalosporinas, los monobactámicos y los carbapenémicos, se encuentran entre los antibióticos más recetados en todo el mundo (Pitout et al., 2020). Específicamente, los genes resistentes a carbapenémicos son de gran relevancia debido a las enzimas hidrolizantes que pertenecen al grupo similar a OXA-48 (Hendrickx et al., 2020). Estas enzimas están codificadas por alelos similares a *bla*_{OXA-48} y abundan entre los *Enterobacterales* en los Países Bajos en un 44%, seguidos de *bla*_{NDM} con un 27% (Van der Zwaluw et al., 2020).

Además, los plásmidos más comunes que albergan *bla*_{OXA-48} pertenecen a la familia IncL/M, que son conjugativos y se han descrito para *E. coli* y *K. pneumoniae* (Hendrickx et al., 2020). Pues, la aparición de genes de resistencia a estos antibióticos como la colistina y productores de carbapenemasas transmitidos por plásmidos representa una amenaza importante para la salud pública.

1.1.7. Resistencia a Antibióticos en el contexto medioambiental

El estudio de la resistencia antimicrobiana se ha enfocado en la dimensión clínica de la propagación de la resistencia bacteriana a los antibióticos; sin embargo, en los últimos diez años, ha habido un aumento en las investigaciones ambientales que analizan los aspectos cuantitativos y cualitativos de la descarga de antibióticos en el ambiente **(Roy et al., 2021)**. Debido a, el uso masivo y abusivo de antibióticos, el cual acelera la evolución de las bacterias resistentes a los antibióticos (ARBs) y los genes resistentes a los antibióticos (ARGs) en el medio ambiente, lo que aumenta el riesgo de transmisión del resistoma ambiental a los seres humanos **(Serwecińska, 2020)**.

La OMS reconoce que las ARBs y los ARGs son contaminantes ambientales emergentes y una grave amenaza para la salud pública **(Ondon et al., 2021)**. Por lo que, es importante destacar que la resistencia a los antimicrobianos es un problema multifacético y su contención requiere un enfoque del mismo tipo. Dado que, el concepto "*One Health*" pone de relieve la interacción entre la salud humana, animal y ambiental, y fomenta la colaboración entre las autoridades sanitarias que se ocupan de estos ámbitos para la contención de la RAM **(Samreen et al., 2021)**.

La evidencia científica sugiere que las bacterias y los genes resistentes están omnipresentes en el medio ambiente, y en el mecanismo de transferencia horizontal de genes, en particular, siendo los integrones los más comunes para la diseminación ambiental de la resistencia **(Li & Zhang, 2022)**. En este contexto, los antibióticos que permanecen en el medio natural pueden convertirse en una fuente de nutrientes para algunos grupos de microorganismos y degradarse; sin embargo, dicha biodegradación depende de varios factores, como la composición de la microflora, el pH, la temperatura y la humedad (*biodegradación microbiana*) **(Yang et al., 2021)**.

Además, el surgimiento y difusión de la resistencia a los antibióticos en reservorios ambientales pone en peligro la efectividad de todos los antibióticos **(Roy et al., 2021)**. Las ARBs y los ARGs se diseminan en el medio ambiente, principalmente con el vertido de aguas residuales urbanas tratadas, el reciclaje de productos de desecho orgánico en la agricultura y, la escorrentía de campo que depende de la pluviometría

y el uso del suelo (**Osińska et al., 2020**). Puesto que, es probable que los ARGs también hayan evolucionado para cumplir otros propósitos además de proteger a las bacterias de los antibióticos; una posibilidad es que las funciones principales de los ARGs en el medio ambiente sean regular las respuestas inducidas por concentraciones subinhibitorias de antibióticos (**Huijbers et al., 2019**).

Principalmente, los residuos de antibióticos, bacterias y genes resistentes ingresan a los ambientes terrestres y acuáticos a través del uso de residuos humanos y de animales (**Wang et al., 2022**). La contaminación del medio ambiente con bacterias fecales facilita el contacto físico y, en consecuencia, incrementa las posibilidades de intercambio genético entre las bacterias residentes en el ambiente y aquellas adaptadas al tracto intestinal de humanos o animales domésticos (**Haenni et al., 2022**). Ya que, muchas bacterias intestinales son reconocidas también por albergar elementos genéticos móviles (MGE, por sus siglas en inglés de *mobile genetic elements*), como plásmidos, elementos integrativos conjugativos o transposones, que pueden propiciar la obtención y transmisión de genes a patógenos (**Larsson & Flach, 2022**).

Por ende, las aguas residuales también contribuyen a la resistencia antimicrobiana; los antibióticos persisten a través de los procesos de tratamiento de aguas residuales (**Pärnänen et al., 2019**). Los efluentes acaban en las aguas receptoras, mientras que los lodos residuales se utilizan como fertilizante; todas estas fuentes de antibióticos y cepas resistentes a antibióticos se hunden en las aguas superficiales y en el suelo agrícola, que las absorbe fácilmente (**Faleye et al., 2019**). Los cultivos se contaminan y sirven como vehículos para la transmisión de bacterias resistentes a la cadena alimentaria contribuyendo silenciosamente a las infecciones por la resistencia antibiótica o a la carga global de enfermedades al causar directamente brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) (**Skandalis et al., 2021**).

Además de reducir el uso de antibióticos, varias estrategias, incluidos los tratamientos de aguas residuales y desechos orgánicos, y/o la gestión ambiental, pueden reducir la propagación de la resistencia y limitar la supuesta acción de los residuos de antibióticos en las comunidades microbianas (**Nadimpalli et al., 2020**). Por su parte, las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) están diseñadas para tratar materia orgánica y nutrientes, pero pueden tener eficiencias variables en cuanto a la

eliminación de contaminantes como residuos de antibióticos, ARB, ARG y MGE (Goulas *et al.*, 2020).

1.1.8. Tecnología De Secuenciación De Próxima Generación

1.1.8.1. Secuenciación del Genoma Completo (WGS)

La secuenciación del genoma completo (WGS del inglés, *whole sequencing genome*) es una herramienta que permite conseguir la secuencia completa de una muestra de ADN, obteniendo una amplia diversidad genética (Dash & Das, 2022). Debido a que, la WGS proporciona información para la caracterización de las bacterias es ampliamente utilizado en el estudio de la RAM, ya que otorga información acerca de la presencia de los genes conocidos y las posibles mutaciones asociadas a la resistencia. Sin embargo, una de las desventajas de la WGS es que en investigación permite identificar e interpretar únicamente genes o mutaciones conocidos o similares (WHO, 2020). La viabilidad del análisis mediante WGS se encuentra vinculado a las tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS, del inglés *Next-Generation Sequencing*) debido a que se requiere de recursos computacionales y bioinformáticos, de alto nivel que permitan analizar datos de secuencias grandes y a la vez complejas (Yin *et al.*, 2019).

1.1.8.2. Oxford Nanopore Sequencing

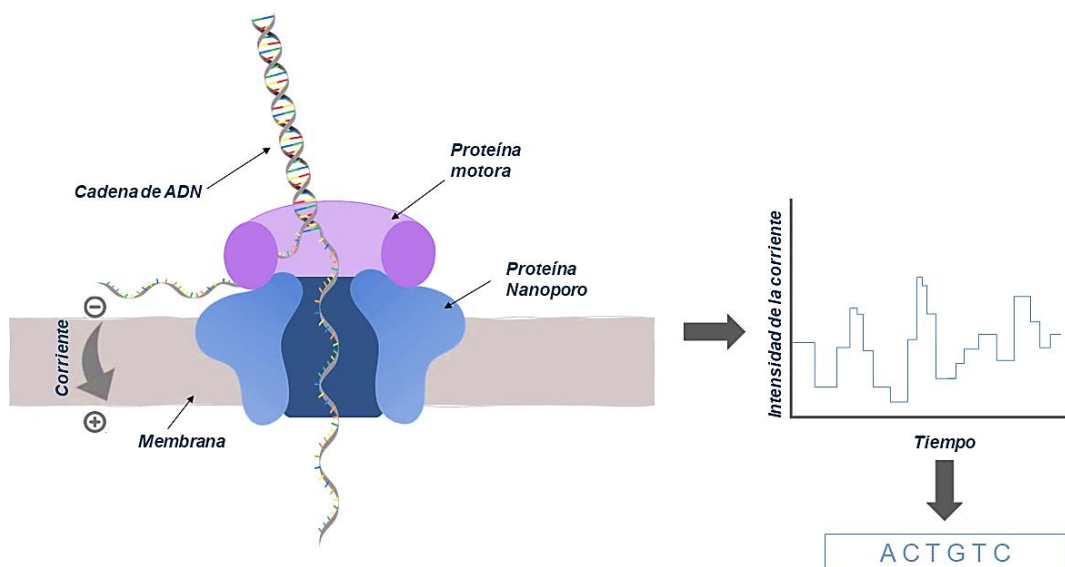
Desde la secuenciación Sanger, las tecnologías de secuenciación de próxima generación como Pacific Biosciences (PacBio) y Oxford Nanopore (ONT, del inglés *Oxford Nanopore Technologies*) han evolucionado significativamente para proporcionar una mayor producción de datos, eficiencias y aplicaciones (Hu *et al.*,

2021). En cuanto a, ONT es una de las tecnologías más recientes que ha sido descubierta por David Deamer, Harvard George Church y Daniel Branton proporcionando en el año 2014 el primer secuenciador de nanoporos denominado MinION (Vasiljevic *et al.*, 2021).

Esta tecnología se fundamenta en nanoporos proteicos que se encuentran integrados a una membrana eléctricamente resistente (Sun *et al.*, 2022). Además, este sistema cuenta con una proteína motora que se encuentra adjunta en la parte superior del nanoporo, la cual cumple una actividad helicasa, es decir que permite que la doble cadena de ADN o ARN se convierta en una molécula de una sola hebra para que atraviese el nanoporo (Jurkowski, 2020). A medida que se ejerce voltaje para que la molécula atraviese el poro se genera un cambio en la velocidad de translocación lo que corresponde a la determinación de la secuencia de nucleótidos, la cual se decodifica mediante el uso de programas computacionales (Wang *et al.*, 2021) (ver Figura 3).

Figura 3

Fundamento de Oxford Nanopore Technologies



Nota. Adaptado de “A pandemic in the age of next- generation sequencing” (p.12), por Beckett *et al.*, 2021, *The Biochemist*, 10(15).

1.1.8.3. Beneficios Y Limitaciones de ONT

Esta tecnología, en cuanto a sus beneficios se caracteriza por ser portátil, de bajo costo y capaz de superar los problemas que surgen con las lecturas cortas, como las repeticiones de todo el genoma y la detección de variantes estructurales. Puesto que, permite la secuenciación de hebras muy largas de ADN o ARN, lo que indica una ventaja para realizar el ensamblaje de genomas que posiblemente anteriormente era considerado inaccesible mediante los métodos de secuenciación de lectura corta **(Wilson *et al.*, 2019)**.

De igual forma, es una tecnología que se destaca debido a que permite obtener la secuenciación en tiempo real, lo que conlleva a una disminución de tiempos **(MacKenzie & Argyropoulos, 2023)**. Por otro lado, las limitaciones de esta técnica en comparación con los métodos de segunda generación es la precisión de las lecturas, debido a una tasa de error alta, la cual cabe destacar que continúa mejorando con el tiempo, particularmente con los avances en el análisis de software **(Delahaye & Nicolas, 2021)**.

1.1.9. Herramientas Bioinformáticas

Las herramientas bioinformáticas facilitan el ensamblaje o mapeo de lecturas, a la secuencia del genoma de referencia **(Olawoye *et al.*, 2020)**. En sí, las herramientas bioinformáticas son aplicaciones computacionales o algoritmos diseñados para analizar e interpretar datos biológicos, en particular conjuntos de datos a gran escala generados por tecnologías de alto rendimiento **(Schwengers *et al.*, 2020)**. Estas herramientas facilitan el almacenamiento, la recuperación, la organización y el análisis de la información biológica y, en última instancia, ayudan a los investigadores a comprender procesos biológicos complejos **(Chen *et al.*, 2020)**.

1.1.9.1. Galaxy Project

Galaxy es una plataforma web de código abierto para la investigación intensiva de datos (**Tyryshkina *et al.*, 2019**). Este software consta de varios componentes: un repositorio integrado de herramientas para una amplia gama de estudios biomédicos, incluidos el análisis de secuencias y variantes, la metagenómica, la proteómica y la transcriptómica (**Afgan *et al.*, 2022**). Permite el análisis exploratorio de datos utilizando las herramientas integradas a través de una interfaz web; una multitud de instalaciones especializadas de la aplicación web (**Jalili *et al.*, 2021**).

1.1.9.2. Proksee Genome Analysis

Proksee es un sistema utilizado para ensamblar, anotar, analizar y visualizar genomas bacterianos (**Grant *et al.*, 2023**).

1.1.9.3. PlasmidFinder

PlasmidFinder es un servidor web utilizado para detectar y clasificar plásmidos en secuencias genómicas completas de *Enterobacteriaceae*, específicamente empleada para identificar la presencia de plásmidos en aislados de *E. coli* (**Carattoli & Hasman, 2020**).

1.1.9.4. ResFinder

ResFinder es una herramienta de bioinformática diseñada para localizar genes de resistencia íntegros y/o variaciones genéticas cromosómicas particulares que provocan resistencia a antimicrobianos en secuencias de ADN bacteriano, ya sean contigs, cromosoma o secuencias completas (**Florensa *et al.*, 2022**). Proporciona análisis bioinformáticos basados en la web, abiertos y de fácil acceso en la plataforma CGE (**Verschuuren *et al.*, 2022**).

1.1.9.5. DiGAlign

DiGAlign (Dynamic Genomic Alignment) es una herramienta avanzada para visualizar alineamientos genómicos, mejorando las capacidades ya presentes en ViPTree. Esta herramienta realiza alineaciones detalladas, ya sean de nucleótidos (usando BLASTn) o de aminoácidos (mediante tBLASTx), a partir de secuencias de nucleótidos ingresadas. Estas alineaciones se muestran de manera interactiva, permitiendo a los usuarios crear figuras de alta calidad listas para ser publicadas. DiGAlign también puede mostrar predicciones de genes y sus funciones, las cuales pueden ser generadas por el propio DiGAlign o suministradas por el usuario. Esta herramienta facilita de manera efectiva la visualización personalizada en estudios de genómica comparativa y análisis estructural del genoma (**Liu *et al.*, 2023**).

1.1.9.6. iTOL

iTOL (Interactive Tree of Life) es una herramienta online que permite visualizar, manipular y realizar anotaciones en los árboles filogenéticos resultantes (**Aldea *et al.*, 2022**).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Analizar el genoma de *Escherichia coli* portadoras de genes de resistencia *mcr-1* y *bla_{OXA-48}* de origen ambiental ecuatoriano utilizando secuenciación de tercera generación

1.2.2. Objetivos Específicos

- Obtener secuencias de genoma completo de *E. coli* portadoras de genes de resistencia *mcr-1* y *bla_{OXA-48}* de origen ambiental de Ecuador utilizando secuenciación de tercera generación.
- Examinar el entorno genético de los genes *mcr-1* y *bla_{OXA-48}* en las secuencias de genoma completo de las cepas de *E. coli* analizadas.
- Evaluar la filogenia de secuencias de genoma completo de cepas de *E. coli* de aislamientos de diferentes orígenes.

CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA

2.1. Materiales

Tabla 3

Materiales utilizados en la ejecución del proyecto de investigación

Material	Cantidad
Reactivos	
PureLink® Genomic DNA Kit	1
Agar MacConkey	500 g
Agar Luria Bertani (LB)	500 g
Etanol 70%	1 L
Material fungible	
Micropipeta (0.5 – 10 μ L)	1
Micropipeta (20-200 μ L)	1
Micropipeta (100-1000 μ L)	1

Material	Cantidad
Puntas de 0.5 – 10 μL con filtro	1 rack (96 unidades)
Puntas de 20 – 200 μL con filtro	1 rack (96 unidades)
Puntas de 100 – 1000 μL con filtro	1 rack (96 unidades)
Asas de inoculación	3
Mechero Bunsen	1
Cajas Petri	50
Tubos de ensayo con tapa rosca	10
Microtubos de 1.5 mL	500
Tubos de 0.2 mL para PCR	500
Espátula	1
Equipos de laboratorio	
Autoclave	1

Material	Cantidad
Balanza analítica	1
Cabina de flujo laminar bioseguridad 2	1
Centrífuga	1
Vórtex	1
Incubadora	1
Cámara de electroforesis	1
Nevera (4°C)	1
Congelador (-20°C)	1
Equipos tecnológicos	
Computador portátil	2
Router para internet	1

Tabla 4*Recursos informáticos*

Recursos	Desarrollador
<i>Base de datos:</i>	
NCBI	Biblioteca Nacional de Medicina, Departamento de Salud y Servicios Humanos EE. UU, Gobierno Federal de los EE.UU.
<i>Herramientas</i>	
<i>bioinformáticas:</i>	
Plataforma CGE	Grupo de Investigación para la Epidemiología Genómica del Instituto Nacional de Alimentos, Universidad Técnica de Dinamarca (DTU).
Galaxy Project	Laboratorio de Nekrutenko en el Centro de Genómica Comparada y Bioinformática de Penn State, Laboratorio Taylor de la Universidad Johns Hopkins y el Laboratorio Goecks de la Universidad de Salud y Ciencias de Oregón
Proksee	Genome Canadá y Genome Alberta.
DiGAlign	Laboratorio de Ciencias Químicas de la Vida, Centro de Bioinformática, Instituto de Investigación Química, Universidad de Kioto, Japón.

Recursos	Desarrollador
BacWGSTdb	Instituto de Medicina Traslacional, Universidad de Zhejiang, China
BV-BRC	El Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas (NIAID del inglés <i>National Institute of Allergy and Infectious Diseases</i>)
iTOL	Ivica Letunic y Peer Bork (Letunic & Bork, 2021).

2.2. Métodos

La investigación presente, propuso llevar a cabo un análisis de las secuencias de genoma completo de cepas de *E. coli* portadoras de genes de resistencia *mcr-1* y *bla_{OXA-48}* provenientes de origen ambiental ecuatoriano, utilizando secuenciación de tercera generación. La secuenciación fue realizada siguiendo la tecnología Oxford Nanopore en Buenos Aires-Argentina.

2.2.1. Obtención de secuencias de genoma completo de *E. coli* portadoras de genes de resistencia *mcr-1* y *bla_{OXA-48}* de origen ambiental de Ecuador utilizando secuenciación de tercera generación

2.2.1.1. Generación de biomasa de los aislamientos

Se utilizó aislamientos de la bacteria *E. coli*, pertenecientes al banco de microorganismos del grupo UTA RAM - One Health. En los cuales, previamente

fueron detectados la presencia de genes de resistencia móvil a colistina (*mcr-1*) y carbapenémicos (*bla_{OXA-48}*), muestreados del Río Cutuchi y del Canal Latacunga-Salcedo-Ambato, respectivamente. Estos aislamientos de origen ambiental, se los sembró en agar MacConkey por estriado. Posterior, se incubó en overnight a una temperatura de 37° C. Se tomó de 1 a 2 colonias para su inoculación en medio de cultivo Caldo LB (Luria Bertani) en tubos de ensayo estériles. Dichos tubos se llevaron a incubación a una temperatura de 37°C durante 18-24 horas (**Luo & Matthews, 2023**).

2.2.1.2. Extracción de ADN del *E. coli* mediante Genomic DNA Mini Kit

Para la extracción de ADN se utilizó el kit comercial Genomic DNA Mini Kit, para la realización del mismo se siguió el protocolo para bacterias Gram-negativas, según especificaciones del fabricante (https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/purelink_genomic_man.pdf) (**Life Technologies, 2013**).

2.2.1.3. Secuenciación del genoma completo de *E. coli* usando ONT

El ADN bacteriano fue secuenciado como parte de la beca del Programa de Biotecnología para América Latina y el Caribe de la Universidad de las Naciones Unidas (UNU Biolac), adjudicada al Dr. William Calero, en los laboratorios del Instituto de Biociencias, Biotecnología y Biología Traslacional (iB3) de la Universidad de Buenos Aires, liderados por la Dra. Laura Kamenetzky. La secuenciación se realizó usando un kit de secuenciación de ligación (SQKRAD004, Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido), siguiendo las instrucciones del proveedor. Las bibliotecas de ADN se secuenciaron usando celdas de flujo PromethION Flow Cell Packs (R10.4.1) durante 16 horas en un secuenciador PromethION 2 Solo (Oxford Nanopore Technologies). Los archivos fast5 obtenidos pasaron por un proceso de

basecalling SUP. Finalmente, los archivos fastq resultantes fueron analizados en el Laboratorio de Investigación en Patógenos de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología (FICIAB).

2.2.1.4. Evaluación de la calidad de las secuencias genómicas

Consiguientemente, con los archivos fastq se los filtró empleando el software Filtrlong, lo que ayudó a examinar la calidad y realizar el filtrado de las secuencias largas de ONT. Posterior, con los archivos filtrados, se realizó una comparación entre estos con los archivos crudos, mediante NanoComp. El cual determinó el efecto del filtrado en el tamaño, calidad y cantidad de las lecturas, los resultados de dicha comparación se pueden ver en el **Anexo 3 y 4**. Por tanto, se obtuvo los parámetros de calidad y cantidad necesarios para ser caracterizados corroborando que el gDNA está apto.

2.2.1.5. Caracterización de secuencias de *E. coli* mediante CGE

La tipificación *in silico* de las WGS de *E. coli* se realizó en el sitio web del Centro de Epidemiología Genómica (CGE, del inglés *Center for Genomic Epidemiology*) (<https://www.genomicepidemiology.org/services/>).

- **Identificación de plásmidos**

Previo a la identificación de plásmidos, se separó el cromosoma de la secuencia de genoma completo, formando un nuevo archivo FASTA únicamente con los contigs correspondientes a los plásmidos. Posterior se cargó dichos documentos a la herramienta PlasmidFinder, la cual identificó el tipo de plásmido y el porcentaje de identidad al que corresponde cada secuencia.

- **Identificación de genes de resistencia a *mrc-1* y carbapenémicos *bla*_{OXA-48}**

Para la identificación de genes de resistencia se cargó los archivos FASTA de las secuencias del genoma completo de *E. coli* a la herramienta ResFinder, la cual permitió la identificación de genes de resistencia que median en las secuencias y además conocer en que contig de la misma se encontraban los genes de interés tanto para *mrc-1* como para *bla*_{OXA-48}.

- **Tipificación de secuencias multilocus (MLST)**

Para la tipificación multilocus de secuencias (MLST, del inglés *multilocus sequence typing*) se empleó la herramienta MLST. Se escogió la clase de microorganismo al que corresponde, en este caso “*Escherichia coli* #1” para obtener el esquema de Achman y “*Escherichia coli* #2” para el esquema de Pasteur. Se cargó los archivos en formato FASTA y se obtuvo los resultados, los cuales se pueden ver en el **Anexo 5, 6, 7 y 8 (CGE, 2022)**.

2.2.1.6. Ensamblado y pulido de secuencias de *mcr-1* y *bla*_{OXA-48}

Para el ensamblado de las secuencias se subió el archivo filtrado en formato fastq y se empleó la herramienta “flye” de la plataforma web Galaxy Project, el cual es un ensamblador de *novu* para lecturas largas y que son propensas a errores (**Koning et al., 2020**). Posterior, se realizó el pulido de los ensamblados mediante la herramienta “Medaka” la cual es una herramienta que utiliza una red neuronal y cuenta con combinaciones específicas a la química de ONT (**Wick et al., 2023**); de la misma se obtuvo el archivo en formato fasta de las secuencias ensambladas.

2.2.2. Examinación del entorno genético de los genes *mcr-1* y *bla*_{OXA-48} en las secuencias de genoma completo de las cepas de *E. coli* analizadas

2.2.2.1. Examinación del entorno genético mediante DiGAlign

Para la comparativa de los plásmidos que contienen el gen *bla*_{OXA-48} y *mcr-1* se utilizó DiGAlign (Dynamic Genomic Alignment) (<https://www.genome.jp/digalign/>) (**Liu et al., 2023**). Pues, esta herramienta permitió realizar las alineaciones detalladas de nucleótidos, usando BLASTn, de esta forma mostró predicciones de los genes, elementos y proteínas que se encontraban cercanos de los genes de interés.

2.2.3. Evaluación filogenética de secuencias de genoma completo de cepas de *E. coli* de aislamientos de diferentes orígenes

2.2.3.1. Descarga de secuencias del genoma completo de diferente origen mediante el NCBI

Las secuencias de genoma completo, se descargó del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, del inglés *Nacional Center for Biotechnology Information*) en formato FASTA, las mismas se almacenaron en una carpeta con el siguiente formato: BioSample_país_año de colección (Ejem: SAMN30467461_Switzerland_2022). En el **Anexo 17 y 18** se encuentra especificado la matriz con el país de origen, fecha de aislamiento, fuente de aislamiento, código de BioSample y el código de ensamblaje.

Para el posterior análisis de la filogenia se descargaron 149 secuencias de genoma completo de aislamientos de *E. coli* originarios de 15 países, para comparar e identificar las diferencias existentes entre los genomas tomados del NCBI y conocer la relación que existe con el aislamiento de origen ecuatoriano que contiene el gen *bla*_{OXA-48}. Considerando la cantidad y diversidad de secuencias de genoma completo

de *E. coli* portadora del gen *mcr-1* de origen ecuatoriano, se tomaron 57 secuencias disponibles en este origen. Todas las secuencias corresponden a diferente origen (clínico, ambiental, animal y alimentario) y año de colección.

2.2.3.2. Evaluación de la presencia de genes de resistencia a antibióticos y virulencia mediante BacWSTdb.

Para el análisis de la presencia de ARGs y genes de virulencia se utilizó la base de datos BacWSTdb (<http://bacdb.cn/BacWGSTdb/Tools.php>) en la herramienta “Análisis genómico múltiple”. Para su utilización, se analizaron por países las secuencias, se filtró por especie, en este caso *E. coli*, en el caso de las secuencias de *bla*_{OXA-48} se utilizó el genoma de referencia 127_CP02337_ST46 y para *mcr-1* se utilizó el genoma de referencia MG_1655_U00096_ST10 (el genoma de referencia se obtuvo por medio del tipo de secuencia del MLST) y se seleccionó el esquema cgMLST para obtener una filogenia preliminar. Se obtuvieron tanto los archivos con los genes de resistencia y genes de virulencia, los cuales serían utilizados para la elaboración de las tablas de metadatos, para complementar los árboles filogenéticos.

2.2.3.3. Elaboración del árbol filogenético mediante Galaxy Sciensano con la herramienta cgMLST.

Para la elaboración de los árboles filogenéticos, se empleó el método de secuencia multilocus del genoma central (cgMLST, del inglés *core genome multilocus sequence typing*), el cual es una ampliación del concepto de MLST. Sin embargo, este se basa en un conjunto fijo de *loci* del genoma para obtener una relación filogenética mucho más específica (Palma *et al.*, 2022). Por lo que, para este fin se utilizó la plataforma bioinformática Galaxy Sciensano (<https://galaxy.sciensano.be/root>) (de Koning *et al.*, 2020). Se importaron las secuencias en formato fasta previamente descargadas de NCBI incluidas las secuencias propias y se realizó una colección de todos los datos.

Posterior, se utilizó la herramienta Multi Locus Sequence Typing (MLST-BLAST) para el análisis de cgMLST de forma individual. Finalmente, se empleó la herramienta “MLST phylogeny” para la obtención del árbol filogenético en formato NWK.

2.2.3.4. Visualización y anotación de árbol filogenético mediante iTOL

Finalmente se utilizó el programa iTOL (Interactive Tree of Life) (<https://itol.embl.de/>) para la visualización y anotación (**Aldea *et al.*, 2022**). A la herramienta se subió el archivo en formato NWK y posterior se realizó las diferentes anotaciones tanto de la tipificación MLST de Achtman y de genes de resistencia como de virulencia.

CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de los resultados

3.1.1. Análisis de secuencias mediante de herramientas bioinformáticas

El análisis de secuencias de genoma completo de los aislamientos se realizó mediante el empleo de una amplia variedad de plataformas y bases de datos bioinformáticas, entre ellas: NCBI, GenBank, herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST, del inglés *Basic Local Alignment Search Tool*), Base de Datos Nacional de Organismos Resistentes a Antibióticos (NDARO, del inglés National Database of Antibiotic Resistant Organisms), Enterobase, pubMLST, Microreact, BacWGSTdb, Centro de Recursos Bioinformáticos para Bacterias y Virus (BV-BRC del inglés *Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center*), CGE, DiGAlign, iTOL, y Proksee. Los resultados de la caracterización de los aislamientos de origen ambiental de *E. coli* son presentados seguidamente.

3.1.1.1. Análisis de secuencias de genoma completo

En este proyecto de investigación, se examinaron dos secuencias de genoma completo de cepas de *E. coli* de Ecuador que se originan en el entorno ambiental, utilizando secuenciación de tercera generación, las cuales fueron seleccionadas en base a un estudio preliminar que identificó la presencia de genes de resistencia móvil a colistina (*mcr-1*) en la cepa de *E. coli* 62A, y carbapenémicos (*bla_{OXA-48}*) en la cepa *E. coli* 17A (Jerez & Lagla, 2023); muestreados del río Cutuchi, y del Canal Latacunga-Salcedo-Ambato, respectivamente. Las características de las secuencias de los genomas completos de los aislamientos analizados se visualizan en la **Tabla 5**.

Tabla 5

Determinación de las secuenciaciones del genoma completo de 2 cepas de E. coli de origen ambiental de Ecuador portadoras de genes de resistencia mcr-1 y bla_{OXA-48}

Aislamiento	<i>E. coli</i> 62A	<i>E. coli</i> 17A
Año de aislamiento	2022	2022
Tipo de muestra	Ambiental	Ambiental
Ubicación geográfica	Latacunga – Cotopaxi	Salcedo – Cotopaxi
Lugar	Río Cutuchi	Canal L-S-A
Coordenadas	0°54'45.0"S 78°37'19.6"W	1°02'07.2"S 78°37'11.8"W
Código	L-RC-PR3	A-C4-2
Gen de resistencia a antibióticos emergente detectado	<i>mcr-1</i>	<i>bla_{OXA-48}</i>
Tamaño del genoma (pb)	4,874,759	4,833,401
Contigs	4	3
Porcentaje G+C (%)	50.73	50.80
Contigs N₅₀ (bp)	4,597,891	4,662,504

Aislamiento	<i>E. coli</i> 62A	<i>E. coli</i> 17A
Contigs L₅₀ (bp)	1	1
CDS	4,867	4,804
tRNA	87	88
rRNA	23	22
Compleitud (%)	99.9	100
Contaminación (%)	0.1	0
No. Acceso BioSample (NCBI)	SAMN38765677	SAMN38767694

La predicción de la calidad del genoma completo se basa en datos estadísticos que abarcan diversos aspectos, como el número total de lecturas (reads), el contenido de guanina-citosina (%GC), el número de contigs, contigs N₅₀ (ver **Anexo 1 y 2**) y L₅₀, así como el porcentaje de completitud y contaminación del genoma (**Goldstein et al., 2019**). Se obtuvo el tamaño de las secuencias de los genomas, para la cepa *E. coli* 62A es de 4.87 Mb, y para la cepa *E. coli* 17A de 4.83 Mb. En el caso de *E. coli*, sus genomas cubren rangos variables de tamaño entre 4.5 a 5.5 Mb (**Hozzari et al., 2020**). Existe una correlación directa con respecto al tamaño del genoma de *E. coli* y su patogenicidad; esta característica de las cepas de *E. coli* representa la plasticidad del genoma, que le confiere una diversidad de patogénesis (**Mageiros et al., 2021**).

En cuanto a, la cepa *E. coli* 62A utilizando secuenciación de tercera generación, se identificó la presencia de 4 contigs, el cual representa a un cromosoma y tres

plásmidos, encontrándose en el contig 1 correspondiente a un plásmido al gen de resistencia *mcr-1*. Por su lado, en la cepa de *E. coli* 17A, se identificó 3 contigs, correspondiente a un cromosoma y dos plásmidos; detectándose en el contig 3 el gen de resistencia a carbapenémicos en estudio, *bla*_{OXA-48}. En base a estos resultados, se consiguió ensamblar por separado a los componentes genómicos del ADN bacteriano, lo cual constituye una ventaja significativa de la tecnología ONT en comparación con las tecnologías NGS basadas en lecturas cortas, en las cuales se dificulta considerablemente el ensamblaje de las lecturas, y su identificación a nivel cromosómico o plasmídico (**Calero et al., 2023**). Sin embargo, una limitación actual de la secuenciación ONT es su menor precisión de lectura en comparación con las tecnologías de lectura corta, cuyos índices de Phred (Q) suelen ser notablemente más altos. No obstante, esta precisión ha mejorado a medida que la tecnología ONT se desarrolla, alcanzando un porcentaje del 99.5% (Q23) de precisión utilizando flowcells R10.4.1, el kit Ligation Sequencing Kit V14, y el basecalling SUP (**Oxford Nanopore Technologies, 2023**).

El porcentaje total de contenido de GC se utiliza como un indicador para evaluar la calidad. El contenido promedio de GC en el genoma de *E. coli* K12, una cepa modelo ampliamente estudiada, es de aproximadamente 50.79%. Esta cifra se basa en la longitud del cromosoma de esta cepa, que es de aproximadamente 4,639,675 pb (**Browning et al., 2023**). Realizando una comparación con los datos bibliográficos y los datos obtenidos de la cepa *E. coli* 62A (4,597,891 pb) y *E. coli* 17A (4,662,504 pb) con el porcentaje de CG de 50.73 y 50.83, respectivamente; se encuentran dentro del rango esperado. En lo que respecta al impacto de la contaminación en la secuenciación, los estudios realizados en ONT han revelado hallazgos prometedores. Se ha comprobado la posibilidad de identificar con éxito variantes en situaciones donde el nivel de contaminación entre muestras supera el 5%, y eliminar efectivamente *in silico* a los fragmentos contaminantes (**Freed et al., 2021**). Este dato es especialmente significativo, al considerar que la cepa *E. coli* 62A, presentó un nivel de contaminación tan bajo como el 0.1%, valor el cual no representa una preocupación considerable en este contexto. En el caso del genoma de la cepa *E. coli* 17A, no fue detectada la presencia de contaminación.

3.1.1.2. Caracterización de secuencias de genoma completo (WGS) de *E. coli* portadores de gen *mcr-1* y *bla_{OXA-48}* utilizando secuenciación de tercera generación.

El enfoque central de este objetivo se basó en la tipificación de las secuencias de genoma completo de dos aislamientos: *E. coli* 62A y *E. coli* 17A portadoras de genes de resistencia *mcr-1* y *bla_{OXA-48}*, respectivamente; mediante secuenciación de tercera generación (TGS, del inglés *Third Generation Sequencing*). El empleo de TGS permitió superar uno de los desafíos inherentes a la secuenciación de lecturas cortas, que se caracteriza por la alta cantidad de contigs y la dificultad para obtener secuencias a nivel cromosómico y de plásmidos; permitiendo mejorar la calidad de ensamblaje y análisis del genoma (Athanasopoulou *et al.*, 2022).

Mediante el empleo de las herramientas del sitio web CGE se determinó el tipo de secuencia (ST, del inglés *sequence type*) del MLST/pMLST, el tamaño en pares de bases (pb), el tipo de plásmido, genes de resistencia y genes de virulencia para ambos aislamientos, correspondientemente. En el caso de la cepa *E. coli* 62A se determinó que pertenece al ST10, mientras que en cuanto a los plásmidos se determinó que el pMLST únicamente se obtuvo para el contig 03, el cual tiene un perfil [F33:A-B-]. De igual forma, se observó la presencia del gen de resistencia *mcr-1* en el contig 1 y el tipo de plásmido identificado corresponde a IncFII (ver **Tabla 6**). Por otro lado, se identificó que el genoma de la cepa *E. coli* 17A corresponde a ST46; lo que concierne al pMLST, se realizó exclusivamente para el contig 03 proporcionando el perfil [F1:A6:B20]. Igualmente, en el contig 03 se estableció la presencia del gen de resistencia *bla_{OXA-48}*, y el tipo de plásmido fue IncFII (ver **Tabla 7**).

Así es como, un dato importante de la caracterización *in silico* demostró que el tipo de plásmido para ambos aislamientos pertenecen a IncFII tanto en la cepa *E. coli* 62A (contig 1) y 17A (contig 3) ver la información en la **Tabla 6** y **Tabla 7**, respectivamente. Por lo que, acerca de la cepa de *E. coli* 62A estudios han demostrado que la diseminación del gen *mcr-1* es mediada tanto por plásmidos y por casetes móviles del gen, factores los cuales han sido los responsables de la propagación de este en distintos tipos de huéspedes, tanto en humanos, animales y alimentos (Lin *et al.*, 2021). Por lo que, el gen *mcr-1* se encuentra en una amplia variedad de plásmidos

como IncI2, IncHI1, IncHI2, IncP, IncX4, IncFI, IncFII, entre otros **(Liu et al., 2021)**. Sin embargo, la presencia de plásmidos de tipo IncF es la más frecuente en aislamientos de *E. coli* portadores del gen *mcr-1* a nivel global **(Calero et al., 2023)**, destacando a IncFII como un plásmido con un rango estrecho de hospedadores, por lo que se encuentra con frecuencia en cepas de *E. coli* portadoras de *mcr-1*, mencionando una incidencia significativa de este tipo de plásmido en aislamientos de origen animal, específicamente de cerdos **(Boonyasiri et al., 2023)**.

Referente a la cepa de *E. coli* 17A, el gen *bla_{OXA-48}* se disemina principalmente a través de elementos móviles de ADN como transposones, integrones, conjugación bacteriana, plásmidos conjugativos, entre otros; los plásmidos que llevan *bla_{OXA-48}* a menudo pertenecen a ciertos tipos, como los plásmidos IncL/M y IncFII **(Yang et al., 2022)**. Estudios indican que el gen *bla_{OXA-48}* en *E. coli* y en otras *Enterobacterales*, como *K. pneumoniae*, se encuentra comúnmente en plásmidos conjugativos del tipo IncL/M; estos plásmidos son importantes vehículos para la diseminación de la resistencia a los carbapenémicos **(Li et al., 2022)**. Asimismo, un estudio realizado en Líbano en un aislado clínico de *E. coli*, IncF resultó positivo para *bla_{OXA-48}*; ubicado en el transposón compuesto Tn6237 **(Moussa et al., 2020)**.

Tabla 6

Caracterización basada en WGS de la cepa E. coli 62A aisladas de origen ambiental de Ecuador portadoras de genes de resistencia mcr-1

No. de Contig	Segmento	Tamaño (pb)	Tipo de plásmido	Genes de resistencia	Genes de virulencia
Contig 2	Cromosoma	4,597,891	-	<i>sul3</i>	<i>acrA;acrB; csgB; ompA; entB;entE;entC; fepA; fepB; fepC;entS;fepD; fepG;entF;fes;fe pA;entD;allB;fi mG;fimF;fimD;f imC;fimA;gspM; gspL;gspK;gspJ ;gspI;gspH;gsp G;gspF;gspE;gs pD;gspC;rcsB; fimH</i>
Contig 1	Plásmido	68,208	IncFII	<i>mcr-1</i>	-----
Contig 3	Plásmido	94,614	IncFII	-----	<i>traT; traJ</i>

No. de Contig	Segmento	Tamaño (pb)	Tipo de plásmido	Genes de resistencia	Genes de virulencia
Contig 5	Plásmido	103,735	IncY	<i>tet(A)</i> ; <i>floR</i> ; <i>qnrB19</i> ; <i>sul3</i>	-----

Nota. Los genes de resistencia y virulencia fueron analizados en las herramientas bioinformáticas: BacWGSTdb y Resfinder.

Tabla 7

Caracterización basada en WGS de la cepa E. coli 17A aisladas de origen ambiental de Ecuador portadoras de genes de resistencia bla_{OXA-48}

No. de Contig	Segmento	Tamaño (pb)	Tipo de plásmido	Genes de resistencia	Genes de virulencia
Contig 1	Cromosoma	4,662,504	-	<i>aph(3'')-Ib</i> ; <i>aadA5</i> ; <i>tet(A)</i> ; <i>sul2</i> ; <i>mdfA</i> ; <i>dfrA17</i>	<i>acrA</i> ; <i>acrB</i> ; <i>csgB</i> ; <i>entB</i> ; <i>entC</i> ; <i>enD</i> ; <i>entE</i> ; <i>entF</i> ; <i>entS</i> ; <i>fepA</i> ; <i>fepC</i> ; <i>fepG</i> ; <i>fyuA</i> ; <i>galF</i> ; <i>gnd</i> ; <i>ugd</i>

No. de Contig	Segmento	Tamaño (pb)	Tipo de plásmido	Genes de resistencia	Genes de virulencia
Contig 3	Plásmido	137,021	IncFII	<i>bla</i> _{OXA-48} ; <i>aph(6)-Id</i> ; <i>mphA</i>	<i>traT</i> ; <i>anr</i> ;
Contig 4	Plásmido	33,876	IncX1	-----	-----

Nota. Los genes de resistencia y virulencia fueron analizados en las herramientas bioinformáticas: BacWGSTdb y Resfinder.

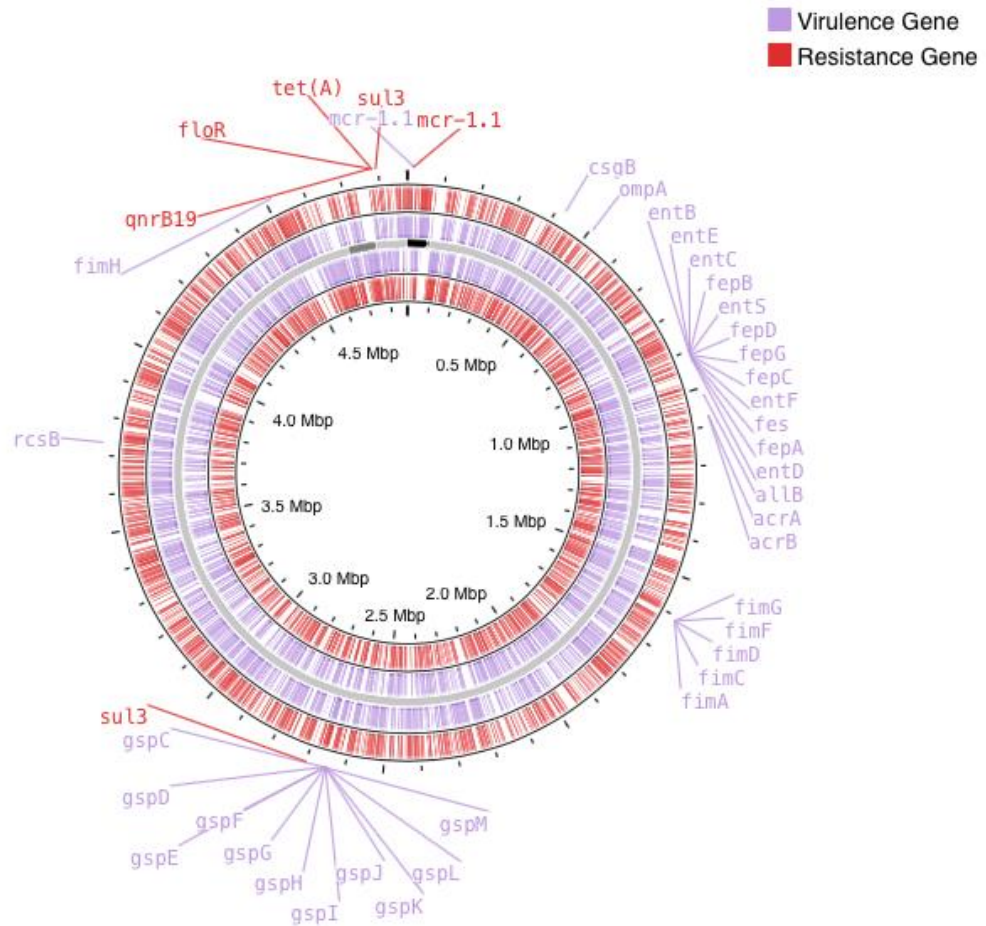
Para ambos aislamientos ambientales de las cepas de *E. coli*, se analizó el mapa circular de la secuencia genómica. En el caso del aislamiento *E. coli* 62A (ver **Figura 4**) se determinó la presencia de genes de resistencia (color rojo); principalmente se destaca el gen *mcr-1* que confiere resistencia a la colistina y se ha descrito ampliamente en *E. coli* y otros géneros de *Enterobacterales* tanto en aislamientos de origen humano, animal, alimentario y ambiental (Ewers *et al.*, 2022 & Phuadraksa *et al.*, 2022). Por otro lado, el gen *sul2* (presente en la cepa *E. coli* 17A) y gen *sul3* confieren resistencia a sulfonamidas y poseen una alta frecuencia de detección en bacterias Gram-negativas, tanto de aislamientos de origen humano y animal (de los Santos *et al.*, 2021 & Jiang *et al.*, 2019), *tet(A)* (gen de resistencia también encontrado en la cepa *E. coli* 17A) responsable de la síntesis de bomba de eflujo *tet(A)* el cual es contribuyente a la resistencia a tetraciclina en *Enterobacterales* (Prewari *et al.*, 2022), *floR* fundamental gen de resistencia al florfenicol principalmente en bacterias Gram-negativas y se ha identificado alta presencia en el ganado (Qian *et al.*, 2021), y *qnrB19* juega un papel en la adquisición de resistencia a quinolonas (Pachanon *et al.*, 2020).

En cuanto a los genes de virulencia (color morado) en la cepa *E. coli* 62A (ver **Figura 4**) se observó la presencia de la categoría de bombas de eflujo multidroga (EP, del inglés *efflux pumps*) (*acrA*, *acrB*) responsables de la resistencia a una amplia variedad

de antibióticos, representando una de las principales EP tanto en *E. coli* y otras *Enterobacterales* (Fanelli et al., 2023), adhesinas fimbriales (*fimA*, *fimC*, *fimD*, *fimF*, *fimG*, *fimH*) representan genes de urovirulencia con alta presencia en cepas de *E. coli* uropatógenas (Katongole et al., 2020), formación de biofilm (*csgB*) gen que codifica la proteína *csgB* involucrada en la formación de fibras curli en biopelículas, síntesis y transporte de sideróforos (*entB*, *entC*, *entD*, *entE*, *entF*, *entS*) involucrados tanto en la biosíntesis de enterobactina (Mu et al., 2020), proteínas de la membrana externa (*ompA*, *gspC*, *gspD*, *gspE*, *gspF*, *gspG*, *gspH*, *gspI*, *gspJ*, *gspK*, *gspL*, *gspM*) son genes relacionados con el sistema de secreción tipo II (Shaik et al., 2022), proteínas regulatorias (*rscB* y *aIIB*), captación y transporte de hierro (*fepA*, *fepB*, *fepC*, *fepD*, *fepG*) (Jarocki et al., 2020) y los genes *traT*, *traJ* los cuales codifican la proteína de membrana externa y la invasión de la barrera hematoencefálica, respectivamente (Wang et al., 2023).

Figura 4

Mapa circular de la secuencia genómica completa de la cepa de E. coli 62A aislada del Río Cutuchi



Nota. Los genes de resistencia y genes de virulencia se encuentran denotados por colores de la siguiente forma: morado (Genes de Virulencia) y rojo (Genes de Resistencia); en este último se encuentra el gen de interés, *mcr-1*, ubicado en el contig 1 (color negro).

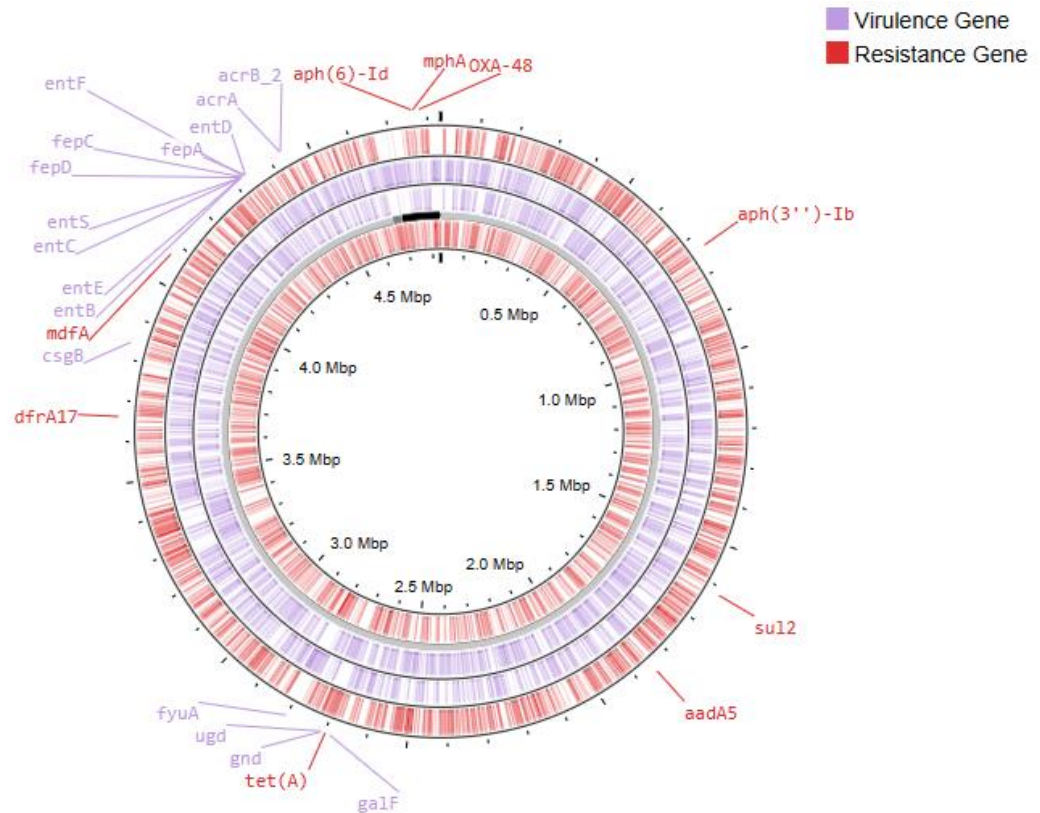
Asimismo, en el análisis del mapa circular de la secuencia de genoma completo de la cepa *E. coli* 17A (ver **Figura 5**) se identificó la presencia de genes de resistencia (color rojo). Especialmente, en este estudio se destaca el gen *bla_{OXA-48}* siendo una causa importante de resistencia a carbapenémicos en *Enterobacterales* e identificados como

una de las β -lactamasas hidrolizantes de este tipo de antibióticos más comunes a nivel mundial (**Armstrong et al., 2021**). No obstante, cabe destacar que la secuencia de genoma completo de la cepa *E. coli* 17A, analizada en este estudio de investigación es el primer aislamiento en contener el gen *bla*_{OXA-48} (ver **Anexo 18**). Por otro lado, los genes *aph(3'')-Id* y *aph(6)-Id* son variantes del grupo de genes *aph* que codifican enzimas fosfotransferasas de aminoglucósidos (**Sha et al., 2023**), *aadA5* codifica la enzima nucleotidiltransferasa de aminoglucósidos (**Behera et al., 2023**); por tanto estos tres genes muestran resistencia a aminoglucósidos, utilizados especialmente para infecciones Gram-negativas (**Firmo et al., 2020**), *mdfA* codifica para un transportador de múltiples fármacos en *E. coli*; además, se ha observado la sobreexpresión de *mdfA* en cepas de *E. coli* resistentes a múltiples fármacos aisladas de pacientes clínicos (**Yoon & Lee, 2022**), *dfrA17* codifica una dihidrofolato reductasa integrónica encontrada en *E. coli* (**Behera et al., 2023**); otorgando resistencia a los antibióticos de la clase de diaminopirimidinas (**Wang et al., 2022**), y *mphA* codifica una fosfotransferasa que confiere resistencia a los macrólidos, una clase de antibióticos a la que pertenece la azitromicina, utilizado en bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* (**Xiang et al., 2020**).

Respecto a los genes de virulencia (color morado) en la cepa *E. coli* 17A (ver **Figura 5**), se determinó la presencia de sistemas de captación de hierro (*fyuA*) gen implicado en la captación de hierro (específicamente por yersiniabactina) que es esencial para el crecimiento bacteriano, fundamental en el entorno limitado en hierro del hospedador (**Rezatofghi et al., 2021**), sistemas de secreción (*galF*, *gnd*, *ugd*) genes involucrados en la síntesis de las estructuras centrales del lipopolisacárido (**Sande & Whitfield, 2021**), proteínas regulatorias pequeñas comúnmente encontradas en patógenos entéricos (*anr*) gen regulador de la respuesta a la anoxia o baja concentración de oxígeno en bacterias (**Wang et al., 2022; Rodriguez et al., 2023**). Cabe indicar que, los genes de virulencia *acrA*, *acrB*, *csgB*, *entB*, *entC*, *entD*, *entE*, *entF*, *entS*, *fepA*, *fepC*, *fepG* y *traT*, fueron también encontrados en la secuencia del genoma completo de la cepa *E. coli* 62A, por lo que ya fueron anteriormente descritos y analizados.

Figura 5

Mapa circular de la secuencia genómica completa de la cepa de E. coli 17A aislada del Canal L-S-A.



Nota. Los genes de resistencia y genes de virulencia se encuentran denotados por colores de la siguiente forma: morado (Genes de Virulencia) y rojo (Genes de Resistencia); en este último se encuentra el gen de interés, *bla_{OXA-48}*, ubicado en el contig 3 (color negro).

3.1.1.3. Examinación del entorno genético de los genes *mcr-1* y *bla_{OXA-48}* en las secuencias de genoma completo de las cepas de *E. coli* analizadas.

Se observó la diversidad del entorno genético tanto de *mcr-1* y *bla_{OXA-48}* con otras secuencias de *E. coli* obtenidas de diferentes orígenes. Con respecto al entorno genético de *mcr-1* se analizó a nuestro plásmido presente en el número de accesión SAMN38765677, con seis secuencias de plásmidos portadores de este gen disponibles en las bases de datos del NCBI de origen ecuatoriano (ver **Figura 6**). En su análisis, se encontró en la sección inferior al gen *mcr-1* el dominio LPD7 (dominio asociado a proteínas polivalentes 7 del inglés *Large polyvalent protein-associated domain 7*) (**H**) evidenciándose un contexto similar en seis de las siete secuencias de plásmidos analizadas. Estas proteínas polivalentes se mencionan que posiblemente son transmitidas mediante elementos conjugativos, plásmidos o fagos (**Iyer et al., 2017**). Por otro lado, en los segmentos superiores al gen *mcr-1* se encontró al transposón IS*ApI1* (**H**) el cual facilita la movilización del gen *mcr-1* (**Hu et al., 2023**). Este gen debe estar flanqueado por dos copias de IS*ApI1* (**Lin et al., 2021**), sin embargo la secuencia de la cepa de *E. coli* 62A mantiene solo uno, lo que indica que limita a que *mcr-1* se someta a un proceso de transposición (**Hu et al., 2023**).

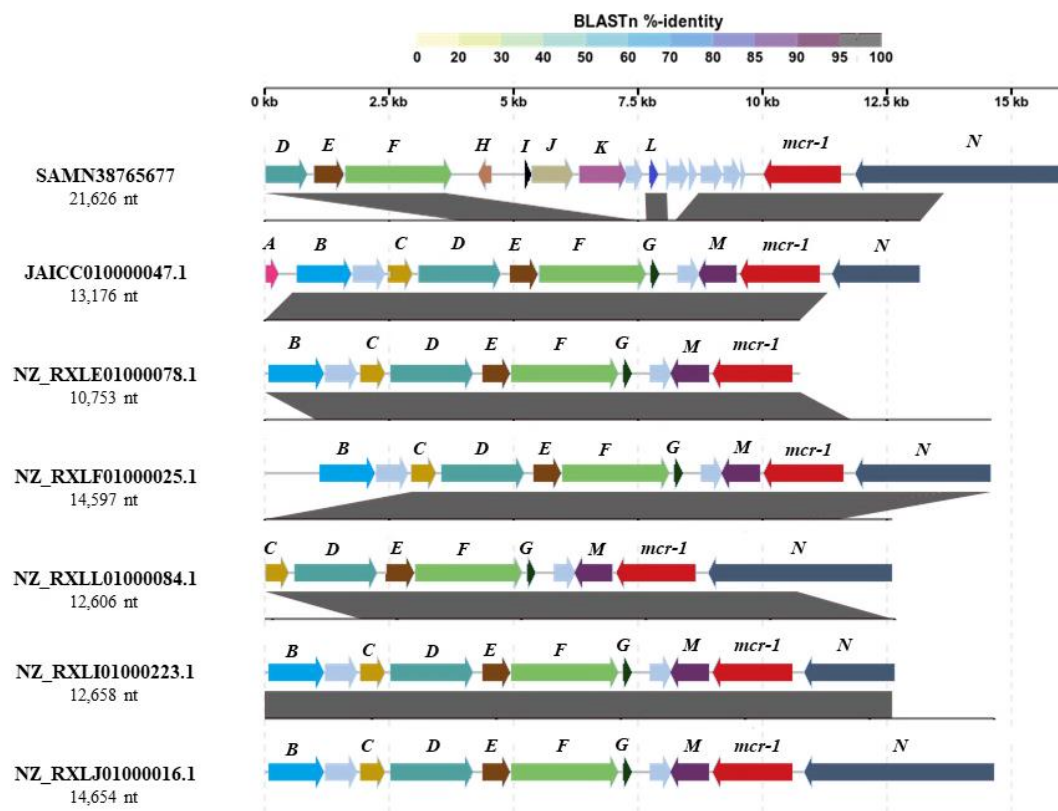
Además, el entorno genético superior del gen *mcr-1* en la secuencia de la cepa de *E. coli* 62A fue la única que presentó hidrolasa de macrólidos *EstT* (**J**), es decir una enzima que descompone a la clase de antibióticos denominados macrólidos, con la finalidad de reducir su eficacia antibiótica (**Dhindwal et al., 2023**); transposasa de la familia IS30 (**K**) y el modulador de la expresión de la hemolisina *Hha* (**L**). Además, mantuvo relación con las otras secuencias analizadas con la presencia de la proteína con dominio PcfJ (**D**), ADN topoisomerasa III (**E**) y topoisomerasa de ADN de tipo IA (**F**). Estas últimas en bacterias actúan como posibles dianas para nuevos antibióticos ya que se encuentra en todas las bacterias (**Seddek et al., 2021**). De igual forma se observó la presencia de las proteínas de la familia de termonucleasas (**C**) en todas las secuencias a excepción de la cepa *E. coli* 62A.

Con la finalidad de identificar si la construcción del plásmido portador del gen *mcr-1* en nuestro aislamiento, se realizó una BLAST para identificar a las secuencias

homólogas a la secuencia del plásmido (contig 1) de la cepa *E. coli* 62A donde se encuentra el gen *mcr-1*. A través de este BLAST (ver **Anexo 14**) se identificó dos potenciales plásmidos con los cuales el plásmido de la cepa *E. coli* 62A es homólogo, obteniendo un 100% con el plásmido pLR-25 (GenBank: AP027502.1) y un 90% con el plásmido pEC1260-mcr (GenBank: OM069356.1), provenientes de aislamientos de *E. coli* procedentes de Vietnam y Bangladesh, respectivamente; diferenciándose considerablemente del entorno genético habitual de los plásmidos portadores del gen *mcr-1* detectados en Ecuador. En el caso del plásmido con número de accesoión AP027502.1 de Vietnam fue obtenido de un aislamiento clínico, a partir de muestras de heces proporcionadas por residentes humanos de la comunidad de la provincia de Thai Binh; la recolección de especímenes se llevó a cabo del 1 de noviembre de 2017 al 28 de febrero de 2018 (**Thanh et al., 2023**). Asimismo, se identificó la secuencia del plásmido con un 90% de homología, es un aislado de Bangladesh de origen clínico (**Sharif et al., 2023**); lo que indica que a pesar de que ambas cepas que presentaron el BLAST casi perfecto en homología para el plásmido de la cepa *E. coli* 62A, son de diferente origen y ubicación geográfica; por lo que se deduce que existe una elevada diseminación a nivel de ambientes y entornos alrededor del mundo.

Figura 6

Entorno Genético de la cepa E. coli 62A con el gen mcr-1



Nota. Las flechas rojas indican los genes de resistencia *mcr-1*, el resto de los elementos de los plásmidos están denotados por letras y las flechas celestes indican genes que codifican proteínas hipotéticas y otras proteínas funcionales. El sombreado de color gris indica regiones de alta homología. **A:** Pilus assembly protein, **B:** Situs specific integrase, **C:** Termonuclease family protein, **D:** PcfJ domain-containing protein, **E:** DNA topoisomerase III, **F:** Type IA DNA topoisomerase, **G:** Transcriptional regulator YdfA, **H:** *ISApI1* family transposase, **I:** *UxaA* family hydrolase, **J:** Macrolide hydrolase *EstT*, **K:** IS30 family transposase, **L:** *Hba*, **M:** PAP2 family protein, **N:** LPD7 domain-containing protein. Los plásmidos que se presentan son únicamente aislamientos de Ecuador.

Para el análisis del entorno genético del plásmido IncFII, presente en el aislamiento *E. coli* 17A (SAMN38767694), el cual contiene el gen *bla*_{OXA-48}, se realizó una comparación con siete plásmidos de diferentes países (Alemania, China, España, Noruega, Reino Unido y Suiza), cuyos números de accesoión del NCBI se reflejan en la figura correspondiente (ver **Figura 7**).

La estructura del plásmido portador del gen *bla*_{OXA-48} es notablemente diferente en contraste con el resto de los plásmidos analizados en esta comparación a su segmento superior. En este segmento se encontraron genes N-acetiltransferasa de la familia GNAT (**A**), dihidropteroato sintasa (**B**) este proceso es un paso crítico en la formación de folatos, que son esenciales para la síntesis de ácidos nucleicos y otros procesos metabólicos en las bacterias (**Gülbudak et al., 2021**), QacE delta 1 (**C**) Se clasifica dentro de la familia de bombas de eflujo de la superfamilia de facilitadores mayores (MFS) y confiere resistencia a agentes desinfectantes y antisépticos, aminoglucósido 3'-adenililtransferasa (**D**) actúa modificando estreptomicina y espectinomicina, lo que les impide llevar a cabo su función antibacteriana efectiva; por ejemplo, en el caso de la bacteria *E. coli*, la presencia del gen *aadA*, que codifica para esta enzima, conduce a la resistencia a estos antibióticos (**Feng et al., 2022**), aminoglucósido adeniltransferasa (**E**) modifica los antibióticos aminoglucósidos, como la estreptomicina y la espectinomicina, a través de un proceso de adenilación (**Ahmed et al., 2020**).

La tirosina recombinasa XerD (**F**) juega un papel crucial en la recombinación específica de sitios en bacterias; junto con otra tirosina recombinasa relacionada, XerC, XerD está codificada en el genoma de la mayoría de las bacterias, TnpA_rve (**G**) desempeña un papel importante en la transposición del ADN y en la inmunidad al objetivo, un fenómeno que evita múltiples inserciones del transposón en la misma región genómica (**Shkumatov et al., 2022**), ARN metiltransferasa de adenina (**H**) involucrada en procesos como la maduración del ARN, la respuesta al estrés y la regulación de la actividad de los ribosomas (**Yu et al., 2021**), metiltransferasa Erm(B) del RNAr 23S (adenina(2058)-N(6)) (**I**) juega un papel importante en la resistencia a macrólidos, debido a que es una enzima que cataliza el proceso de metilación de adenina en la posición 2058 del rRNAr 23S, logrando que la metilación por *Erm*(B) impida la unión de los macrólidos a esta posición específica llevando a que ocurra

resistencia a antibióticos **(Stsiapanava & Selmer, 2019)**, el péptido líder de atenuación de la metiltransferasa del ARNr 23S (**J**), la transposasa de la familia IS26 del elemento IS6 (**K**) son capaces de movilizar y difundir ARGs en bacterias Gram-negativas **(Pong et al., 2021)**, transposasa IS1(**L**) se encuentran asociadas a la transposición de **(Darphorn et al., 2022)**, encontrándose en los plásmidos pOXA-48 **(Hendrickx et al., 2021)**.

Por lo que, en los segmentos en los que no se guarda homología entre nuestro plásmido de interés y los demás analizados (región entre 0-10 kb), en ciertas accesiones se manifestó la presencia del iniciador de la replicación del plásmido RepA (**V**) es una proteína esencial en la replicación del ADN de diversos plásmidos bacterianos, proteína de transferencia conjugativa TrbC (**W**) interactúa con otras proteínas para facilitar la conjugación bacteriana **(Kishida., et al 2022)**, proteína de intercambio tiol:disulfuro (**X**) juegan un papel crucial en varios procesos biológicos, incluyendo la formación y reordenamiento de enlaces disulfuro en proteínas **(Ciaravolo et al., 2023)**, proteína con dominio de transglicosilasa lítica (**Y**) son importantes enzimas bacterianas que desempeñan un papel crucial en la remodelación del peptidoglicano siendo componentes esenciales de la pared celular bacteriana **(Jenkins et al., 2019)**, proteína de la familia de las fosfatasa de histidina (**Z**) estas proteínas comparten un núcleo catalítico conservado centrado en un residuo de histidina que se fosforila durante el transcurso de la reacción **(Rigden, 2020)**.

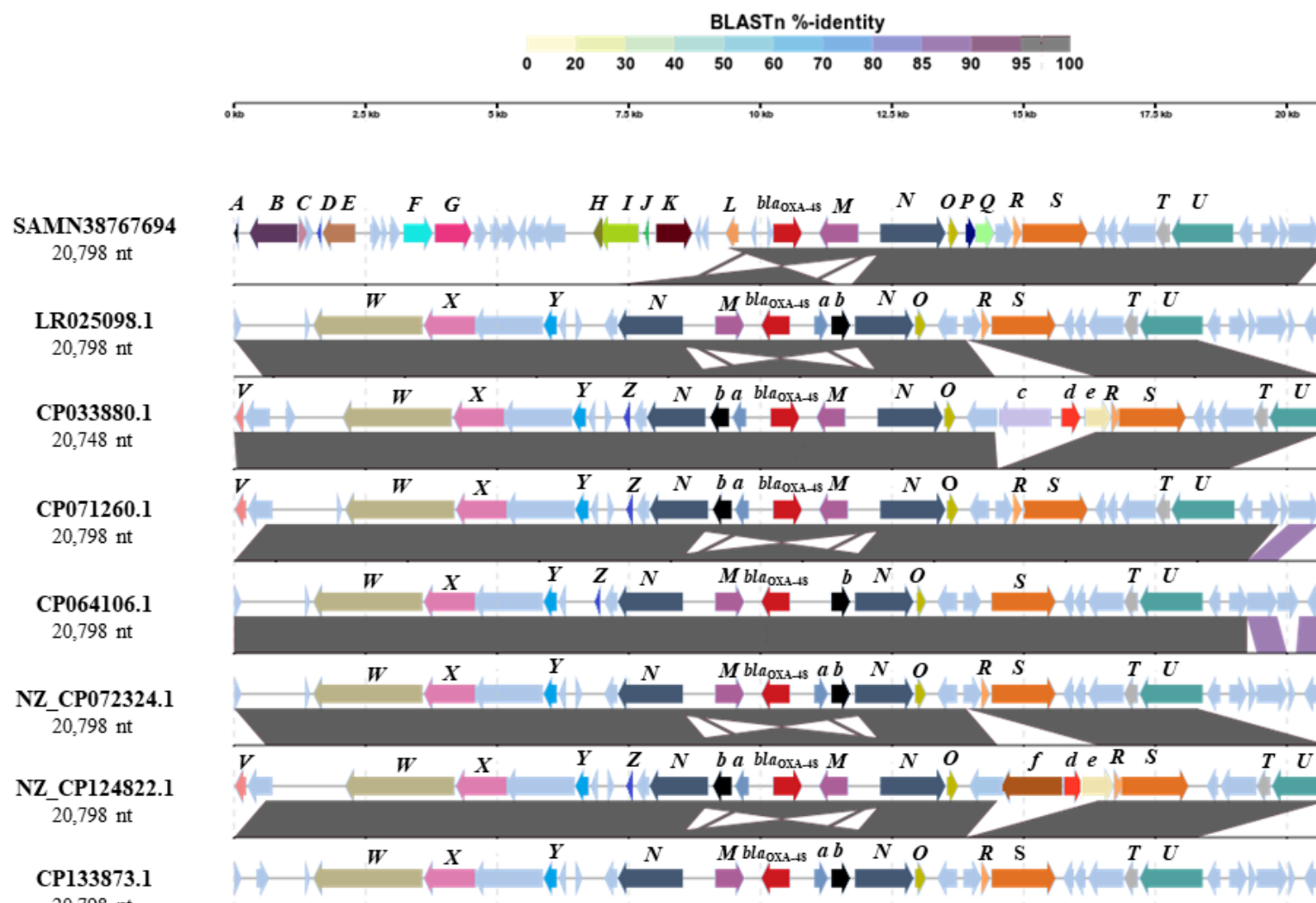
Sin embargo, en el segmento inferior delimitado entre 10-20 kb se visualizó una mayor homología con las secuencias de los otros siete plásmidos comparados. Puesto que, la homología fue bastante evidente por la identificación del regulador transcripcional de la familia LysR (**M**), actúan como activadores o represores de la transcripción y del gen que estén regulando **(Rodionova et al., 2022)**, transposasa de la familia IS10A del elemento *IS4* (**N**), estos elementos desempeñan un papel importante en la plasticidad de los genomas bacterianos **(Lin et al., 2022)**, a la hora de influir en la expresión génica y las vías metabólicas subsiguientes en las bacterias **(Wakinaka & Watanabe, 2019)**, gen codificador de endopeptidasa glutámica intermembrana de la familia CPBP (**O**) compuestas por proteasas intermembranales que participan en una serie de eventos de proteólisis regulada cerca de las membranas plasmáticas e intracelulares **(Houston et al., 2022)**.

La ADN polimerasa V propensa a errores de translesión autoproteolítica (**R**) es crucial en la respuesta de daño del ADN en *E. coli*; esta polimerasa, parte del regulón SOS de *E. coli*, es activada por la proteína RecA y participa en el mecanismo de la síntesis translesión (TLS, del inglés *translesion synthesis*), permitiendo la replicación del ADN en presencia de lesiones, subunidad UmuC de la ADN polimerasa V propensa a errores de translesión (**S**) es una polimerasa de la familia Y que se activa como parte de la respuesta SOS en bacterias como *E. coli*, es conocida por su capacidad para sintetizar ADN en presencia de lesiones en la cadena de ADN que impiden la replicación normal. La polimerasa V se compone de UmuC, que es la subunidad polimerasa (**Sikand et al., 2021**), regulador transcripcional hélice-giro-hélice (**T**) es un elemento común en los factores de transcripción básicos y específicos; además, un mecanismo crucial en la unión al ADN que influye en la regulación de la actividad génica de manera significativa (**Tecalco et al., 2021**), antitoxina de la familia RelB/DinJ del sistema de toxina-antitoxina tipo II (**U**) son elementos genéticos pequeños compuestos por una proteína tóxica y su antitoxina correspondiente, esta última contrarresta la toxicidad de la primera (**Ramisetty, 2020**).

Además, se presentaron antitoxina (**P**), son fundamentales en la respuesta al estrés, la persistencia bacteriana y la defensa contra los fagos; además, pueden influir en la evolución bacteriana y en la adaptabilidad a diferentes ambientes (**Jurėnas et al., 2022**), toxina endorribonucleasa PemK del sistema de toxina-antitoxina tipo II (**Q**) los sistemas de toxina-antitoxina tipo II se encuentran comúnmente en los genomas bacterianos y están compuestos por dos proteínas: una toxina y una antitoxina; la toxina inhibe un proceso celular crítico, mientras que la antitoxina interactúa con la toxina para atenuar su actividad (**Ramisetty, 2020**). Estos dos últimos (**P** y **Q**) no se presentaron en el resto de secuencias de los plásmidos, solamente en la secuencia aislada del Ecuador, por lo que, es importante detallarlos.

Figura 7

Entorno Genético de la cepa *E. coli* 17A con el gen *bla_{OXA-48}*



Nota. Las flechas rojas indican los genes de resistencia *bla_{OXA-48}*, el resto de los elementos de los plásmidos están denotados por letras y las flechas celestes indican genes que codifican proteínas hipotéticas y otras proteínas funcionales. El sombreado de color gris indica regiones de alta homología. **A:** GNAT family

N-acetyltransferase, **B**: Dihydropteroate synthase, **C**: QacE delta 1, **D**: Aminoglycoside 3'-adenylyltransferase, **E**: Aminoglycoside adenylyltransferase, **F**: Tyrosine recombinase XerD, **G**: TnpA_rve, **H**: rRNA adenine methyltransferase, **I**: 23S rRNA (adenine(2058)-N(6))-methyltransferase *Erm(B)*, **J**: 23S rRNA methyltransferase attenuation leader peptide, **K**: *IS6*-like element *IS26* family transposase, **L**: Transposase *IS1*, **M**: LysR family transcriptional regulator, **N**: *IS4*-like element *IS10A* family transposase, **O**: CPBP family intramembrane glutamic endopeptidase, **P**: antitoxin, **Q**: type II toxin-antitoxin system toxin endoribonuclease PemK, **R**: translesion error-prone DNA polymerase V autoproteolytic, **S**: Translesion error-prone DNA polymerase V subunit UmuC, **T**: helix-turn-helix transcriptional regulator, **U**: type II toxin-antitoxin system RelB/DinJ family antitoxin, **V**: plasmid replication initiator RepA, **W**: conjugal transfer protein TrbC, **X**: Thiol:disulfide interchange protein, **Y**: lytic transglycosylase domain-containing protein, **Z**: histidine phosphatase family protein, **a**: *IS1*-like element transposase, **b**: *IS1* family transposase, **c**: group II intron reverse transcriptase/maturase, **d**: ATP binding protein, **e**: Error-prone repair protein UmuD, **f**: Group II intron reverse transcriptase maturase. Los plásmidos son aislamientos de los siguientes lugares en el orden detallado: Ecuador, Alemania, Noruega, Suiza, China, Alemania, España y Reino Unido.

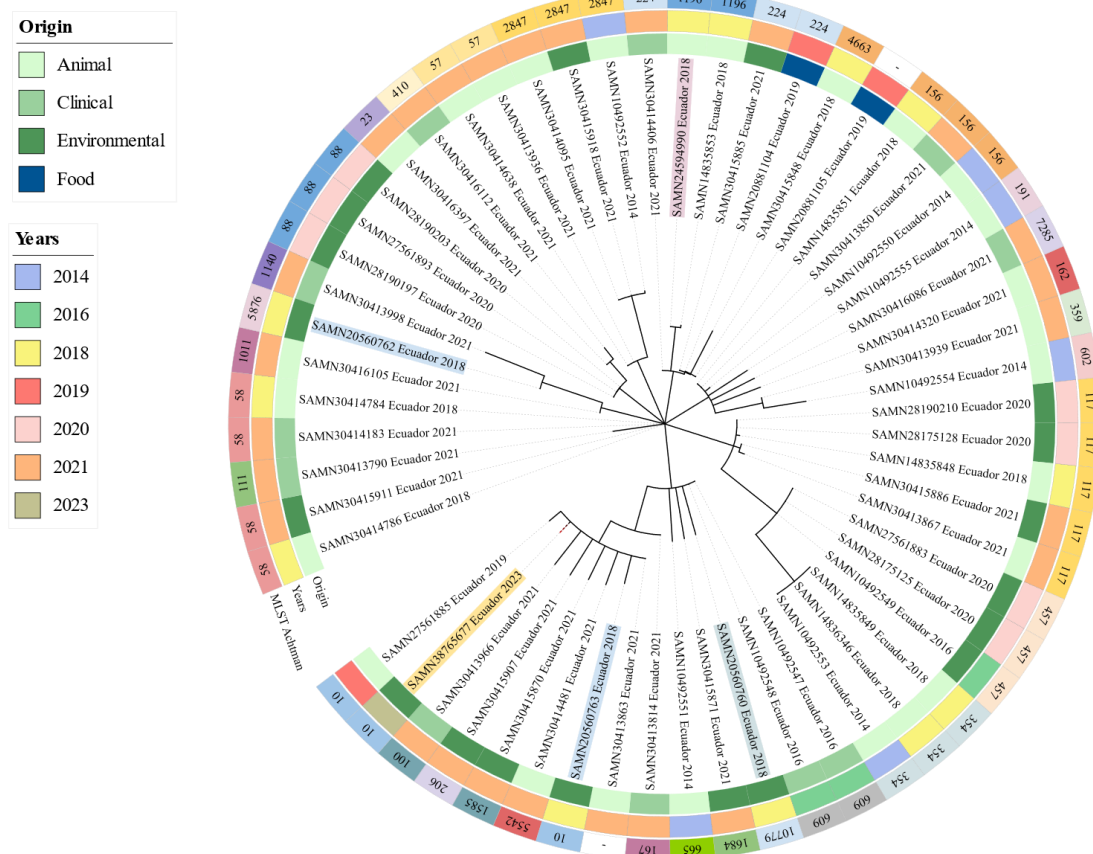
3.1.1.4. Evaluación de la filogenia de secuencias de genoma completo de cepas de *E. coli* de aislamiento de diferentes orígenes

Mediante la tipificación MLST se identificó una alta diversidad en cuanto a los tipos de MLST en los aislados de *mcr-1* de origen ecuatoriano (ver **Figura 8**), ya que los mismos pertenecían a 32 tipos diferentes de ST. En el caso de la cepa *E. coli* 62A de origen ambiental se obtuvo el valor de ST10 (5,17%). De acuerdo con varios estudios se menciona que este tipo de ST es el linaje más abundante de *E. coli* (**Zong et al., 2018**) y se encuentra tanto en matrices animales, ambientales y clínicas (**Kamal et al., 2021**). Este tipo de secuencia es el mismo de un aislamiento de ganglios mesentéricos de origen animal de Quito del 2019, así como también del aislado ambiental de sedimentos de un canal de riego de Quito del año 2018. Sin embargo, de acuerdo al estudio de **Zong et al., (2018)**, indica que el ST167 y ST617 es considerado un clado hermano al ST10, ya que mantiene una variante de un solo locus con respecto al linaje del ST10; en este caso se reporta en la **Figura 9** el ST167 (1,72%) correspondiente de un aislamiento de origen humano.

Cabe mencionar que el ST10 corresponde a un complejo clonal de alto riesgo global, el cual se encuentra asociado con diversos huéspedes capaces de llevar plásmidos que posean genes de resistencia (**Sano et al., 2023**). De acuerdo con un estudio se mencionó que en los aislados de *E. coli* de Ecuador los tipos de secuencias mayoritarias correspondían a ST48 y ST10 y los mismos eran predominantes a resistencia a colistina con *mcr-1*, destacando que principalmente ST10 contribuía a la diseminación de cepas de *E. coli* resistentes a este antibiótico (**Hoang et al., 2023**). Por otro lado, se señala que la presencia de clones pertenecientes a ST10, ST224 y ST457 son portadores a un amplio grupo de genes de resistencia, entre ellos betalactámicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, trimetoprima y fenicoles (**Sano et al., 2023**).

Figura 8

Mapa circular de MLST de la secuencia genómica completa de la cepa E. coli 62A aislada del Río Cutuchi



Nota. En la figura los números representan los MSLT de Achtman de cada aislamiento. Los nombres de los aislamientos marcados de color azul, morado y amarillo pertenecen al banco de cepas UTA RAM-ONE HEALTH. El aislamiento de color amarillo es el que contiene el gen de interés, *mcr-1*.

Asimismo, la tipificación MLST de los aislamientos del gen *bla*_{OXA-48} determinó una alta variedad en cuanto a los tipos de MLST (ver **Figura 9**), los cuales pertenecían a 42 tipos diferentes de ST. Un estudio realizado en Ghana, identificó 20 diferentes tipos de secuencias (STs) de 25 aislamientos caracterizados de genoma de secuencia completo en cepas de *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (ESBL, del inglés *Extended Spectrum Beta-Lactamases*) aisladas de pacientes en dos hospitales del lugar (**Mahazu et al., 2022**), siendo ST131 el grupo dominante, pues es considerado altamente peligroso, hablando en términos epidemiológicos (**Pitout & Finn, 2020**). En la **Figura 10**, se visualiza los MLST de los 150 aislamientos incluido el aislamiento de la cepa *E. coli* 17A, se identificó que estos aislados provienen en su mayoría de origen clínico; además, el ST131 (9.33%) contienen 14 secuencias provenientes de los todos los continentes analizados. Por lo que, otro estudio determinó tres STs prevalentes a nivel mundial: ST167, ST410 y ST131; se encontró que estos tipos de secuencia presentaban una alta prevalencia de genes de resistencia a los carbapenémicos, incluyendo *bla*_{OXA-48} (**Huang et al., 2024**).

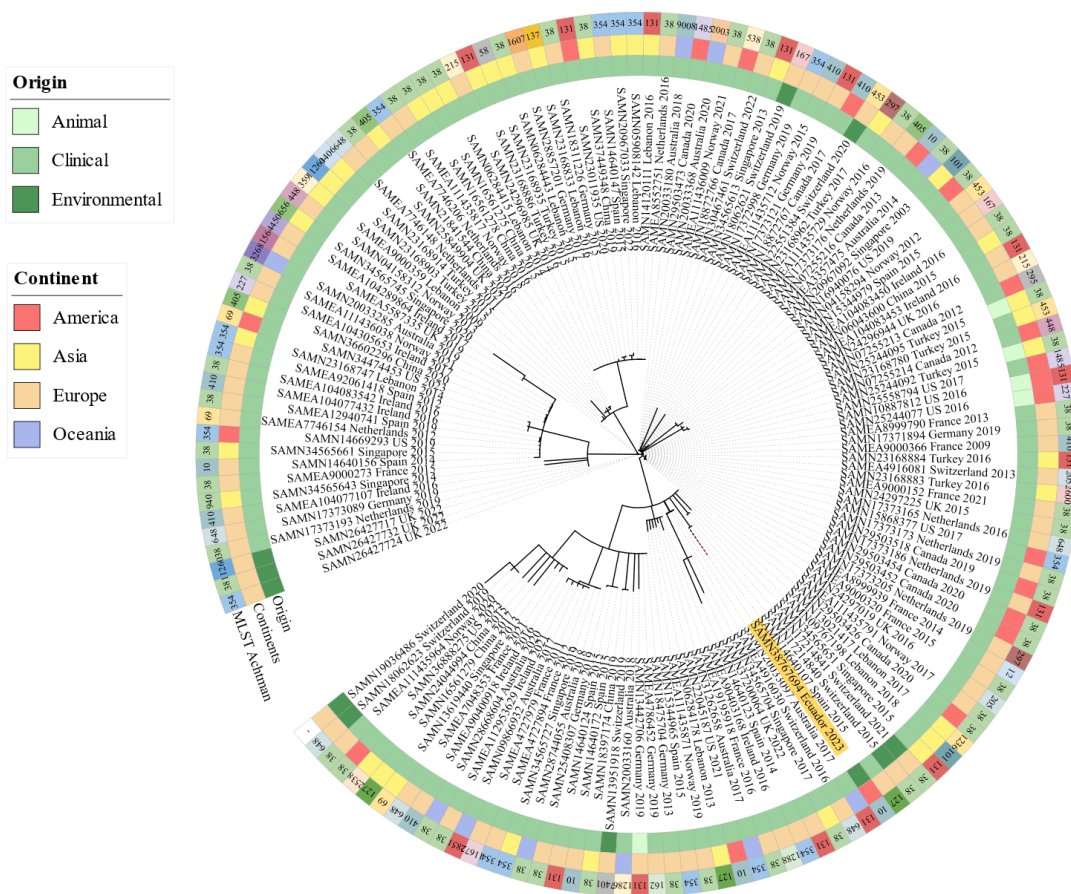
Por otro lado, el ST el cual se encuentra en la mayoría de secuencias es el ST38 (32.67%), presente en 49 aislamientos, originarios de los cuatro continentes, mayoritariamente localizado en Europa (59.18%). En este contexto, un estudio llevada a cabo en España, analizó la diversidad clonal de *E. coli* productoras de ESBL aisladas de ambientes acuáticos, muestras humanas y alimentarias de 61 aislamientos; determinó que el perfil genético de las 13 cepas de *E. coli* productoras de ESBL aisladas de muestras humanas, sólo se identificaron en cinco ST, siendo ST131 la más prevalente (30,8%), en relación a los aislamientos de origen ambientales acuáticos, lo que significó la presencia de 20 diferentes STs de 27 secuencias, ST131, ST1434, ST1486 y ST38 (7.4%), siendo la última más frecuente (**Etayo et al., 2022**).

Asimismo, el ST10 (3.33%), el cual contiene la cepa *E. coli* 17A, se presenta geográficamente en América y Europa, siendo el aislado de origen ecuatoriano el único aislamiento ambiental en contraste con los aislamientos clínicos, provenientes de los otros países (Canadá, España y EE.UU.) con este ST. No obstante, un estudio realizado en Polonia mostró nueve tipos de secuencia diferentes, y la ST dominante fue la ST93 (29,41%), seguida de la ST117 (17,65%), la ST156 (11,76%), la ST 8979 (11,76%), ST744 (5,88%) y ST10 (5,88%), estos han sido aislados e identificados previamente

entre aves de corral en EE.UU., Europa, Asia y Australia; por lo que se indica que el ST10 es muy poco común en este tipo de aislamientos (Ćwiek *et al.*, 2021).

Figura 9

Mapa circular de MLST de la secuencia genómica completa de la cepa de E. coli 17A aislada del Canal L-S-A



Nota. En la figura los números representan los MSLT de Achtman de cada aislamiento. El aislamiento de color amarillo es el que contiene el gen de interés, *bla*_{OXA-48}.

Se comparó los aislamientos de *E. coli* tipificados en el presente proyecto de investigación con aislamientos de varios orígenes y países, con el fin de evaluar la filogenia de genes de resistencia y genes de virulencia (ver **Anexos 9 y 10**) de la cepa *E. coli* 62A y (ver **Anexos 11, 12 y 13**) de la cepa *E. coli* 17A. Los análisis se llevaron a cabo en contraste con 57 aislamientos de diferente origen entre ellos animal, alimentario, clínico y ambiental exclusivamente de Ecuador para el caso de la cepa *E. coli* 62A, y con 149 aislamientos de diferente origen geográfico tomando en cuenta 15 países alrededor del mundo para el caso de la cepa *E. coli* 17A. Se realizó un análisis filogenómico cgMLST comparativo basado en secuencias de genoma completo utilizando Galaxy Sciensano. Consecuentemente, se visualizó y se realizó las anotaciones con la herramienta iTOL.

En las **Figuras 10 y 11**, se visualiza el árbol filogenético rectangular con los 58 aislamientos del genoma completo más la cepa *E. coli* 62A, en donde todos los aislados corresponden a diverso origen del Ecuador. Por su parte, en las **Figuras 12, 13 y 14** se encuentra el árbol filogenético rectangular de la cepa *E. coli* 17A de origen ambiental ecuatoriano con 149 secuencias de genoma completo correspondiente a 15 países entre ellos Alemania, Australia, Canadá, España, Estados Unidos, Francia, Holanda, Irlanda, Líbano, Noruega, Reino Unido, Singapur, Suiza, Turquía, cada país con 10 aislamientos a excepción de China, el cual cuenta con 9.

Con respecto al árbol filogenético rectangular correspondiente al aislamiento *E. coli* 62A marcado en color amarillo (ver **Figura 10 y 11**) presenta nueve ARGs (15.52%), entre ellos genes correspondientes a la familia de los β -lactámicos (*bla*_{CTX-M-55}), trimetoprimas (*dfrA1*), tetraciclinas (*tetA*), sulfonamidas (*sul3*), fluoroquinolonas (*qnrB19*), polimixinas (*mcr-1*), aminoglucósidos (*aadA1*), genes de bomba de eflujo a múltiples fármacos (*mdfA*) y a fosfomicina (*floR*). Cabe destacar que el gen *mcr-1* se encontró en el 100% de las secuencias analizadas, distribuido mayoritariamente en aislamientos de origen animal con el 44.83% (26/58), seguidos de los aislamientos de origen ambiental (32.76%), clínico (18.96%) y alimentos (3.45%). Así pues, de las secuencias de los 57 aislamientos en contraste con la cepa aislada, la cepa *E. coli* 62A se originó de un mismo clado en conjunto con otros siete aislamientos (ver **Figura 11**), destacando entre ellas las cepas de origen ambiental, sin embargo, cabe mencionar que las mismas son de diferente año.

Por otro lado, en cuanto a los ARGs se presenta el gen *mdf(A)* el cual se encontró en un 98.27% (57/58) de las secuencias analizadas, mostrando mayor prevalencia en aislamientos de origen animal. Se destaca varios artículos en los cuales describen que la presencia de este gen en aislados de *E. coli* es bastante común, por ejemplo en un estudio en Bangladesh de 32 aislamientos de origen animal se encontró 31 de ellos con el gen *mdf(A)*, de igual forma, en una ciudad de Arabia Saudita se encontró el gen *mdf(A)* en todos los aislamientos de origen clínico estudiados (**Ahmed et al., 2020 & Yasir et al., 2020**). La alta prevalencia de este gen se debe a que es un gen descrito originalmente en cepas de *E. coli* (**Munk et al., 2022**), además se debe a que es un transportador de membrana que es frecuente en esta bacteria (**Cifuentes et al., 2022**).

Asimismo, otro de los genes de mayor frecuencia se describe a *tet(A)* con una prevalencia del 60.35% (35/58) con un predominio en las secuencias de origen animal. Es un gen frecuente debido a que se encuentra mayoritariamente en bacterias Gram-negativas (**Jahantigh et al., 2020**). Cabe mencionar que se han identificado alrededor de nueve genes que codifican tetraciclina en *E. coli* destacando entre ellos *tet(A)*, *tet(B)* y *tet(C)* (**Ramírez et al., 2023**). De acuerdo a un estudio se identificó que el gen *tet(A)* se encontró en un 90.2% de las secuencias analizadas, las cuales principalmente correspondían a aislados de origen animal, destacándose las aves de corral (**Di Francesco et al., 2021**). De igual forma, otro estudio menciona que de aislados de origen ambiental su totalidad presentaba la presencia del gen *tet(A)*, esto debido a su alta prevalencia en el medio ambiente, ya que se menciona que su presencia es frecuente en lodos activados, efluentes tratados, agua potable y aguas residuales (**Hubeny et al., 2019**).

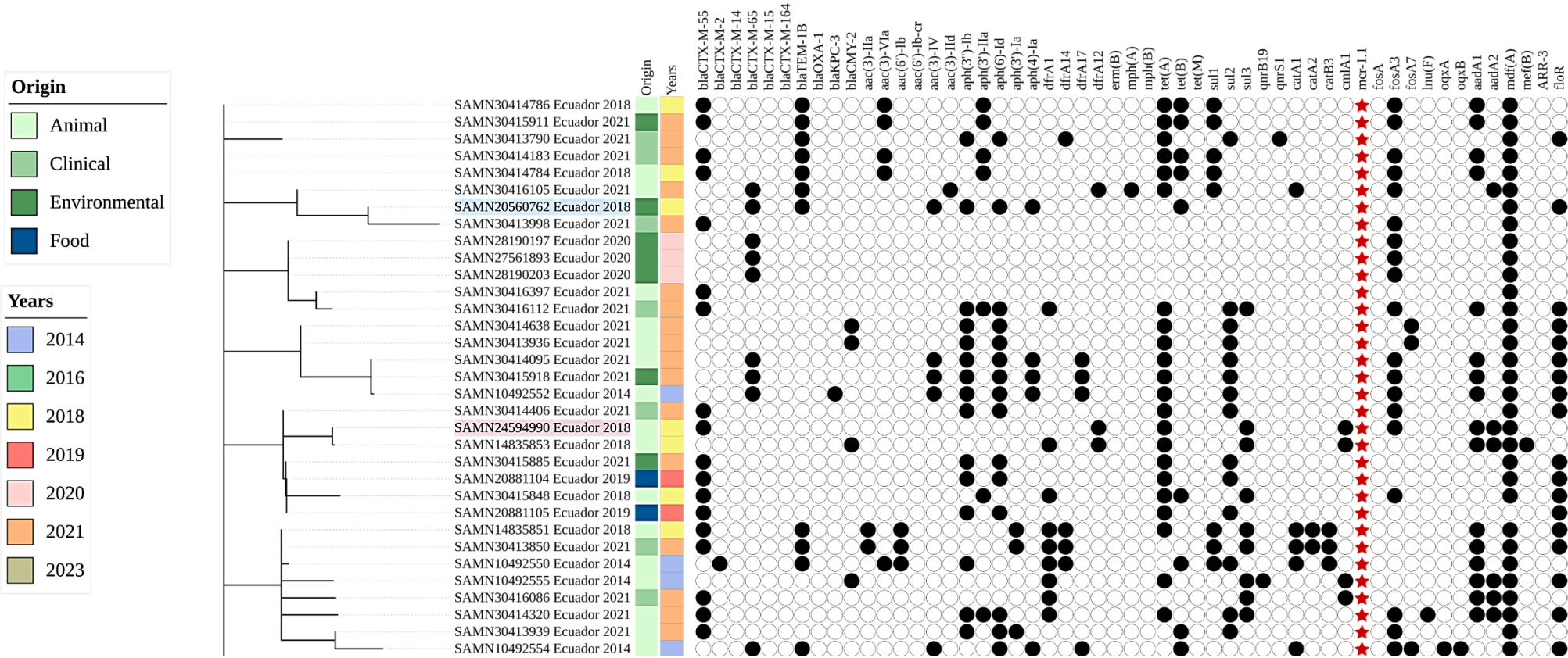
Por su parte, el gen *bla_{CTX-M-55}* se encontró en alrededor del 55.17% (32/58) de las secuencias de origen ecuatoriano analizadas en este estudio, correspondientes a un 37.5% (12/32) de origen animal, 28.13% de origen ambiental, 28,13% de origen clínico (9/32) y 6.25% (2/32) de origen alimentario. Esto se debe a que *bla_{CTX-M}* es el gen correspondiente β -lactamasas de espectro extendido (ESBL) mayormente distribuido (**Valenzuela et al., 2023**). De acuerdo a un estudio se menciona que tanto el gen *bla_{CTX-M-55}* como *bla_{CTX-M-65}* y *bla_{CTX-M-15}* son los genes más frecuentes encontrados en aislamientos de Ecuador (**Montero et al., 2021**).

El gen *dfrA1* se manifiesta en un 29.31% (17/58) de las secuencias analizadas. Varios genes *dfrA* se encuentran acoplados a los genes que confieren resistencia a sulfonamidas (*sul*), esto se debe a que son genes que se han diseminado mediante clados bacterianos relacionados a distancia, es decir, que comparten un ancestro en común, en este caso principalmente asociados a elementos transponibles mediante integrones (**Sánchez et al., 2020**). En el caso de las secuencias analizadas se presentó la presencia del gen *sul2* en un 43.10%, mientras que del gen *sul3* alrededor del 34.48% de las secuencias analizadas incluyendo la cepa de *E. coli* 62A. Por lo que, la alta prevalencia de sulfonamidas en las secuencias analizadas indica que son genes altamente frecuentes en bacterias Gram-negativas en todo el mundo, ya sea de aislados de origen clínico, animal o de especies acuícolas (**Jiang et al., 2019**). Además, se comprobó lo previamente mencionado, ya que para las secuencias positivas para el gen *dfrA* mantienen de igual forma una relación positiva para el gen *sul2* o *sul3*.

Por otro parte, otro de los genes presentes en la cepa *E. coli* 62A corresponde a *floR*, el cual se encuentra positivo para la mitad de las secuencias analizadas, en mayor parte en las de origen animal (48,27%), esto se debe a que el antibiótico florfenicol, ha sido empleado en la terapia de enfermedades en animales destinados al consumo humano (**Qian et al., 2021**). Cabe mencionar que se destaca que existe una limitación de información acerca de la resistencia a florfenicol en *Enterobacteriaceae* específicamente en especies como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella enterica*, entre otros (**Ying et al., 2019**). Finalmente, se analizó acerca del gen *qnrB19* el cual se presentó como uno de los genes con menor prevalencia en las secuencias analizadas, ya que mantuvo un resultado positivo en el 12,08% (7/58) de los aislamientos estudiados. Su bajo porcentaje de diseminación se podría deber a que se presenta más información en aislamientos de cepas de *Salmonella*. Sin embargo, la presencia de este gen en aislados de *E. coli* representa una fuente más de estudio para conocer la diseminación de este, dentro y fuera de Ecuador.

Figura 10

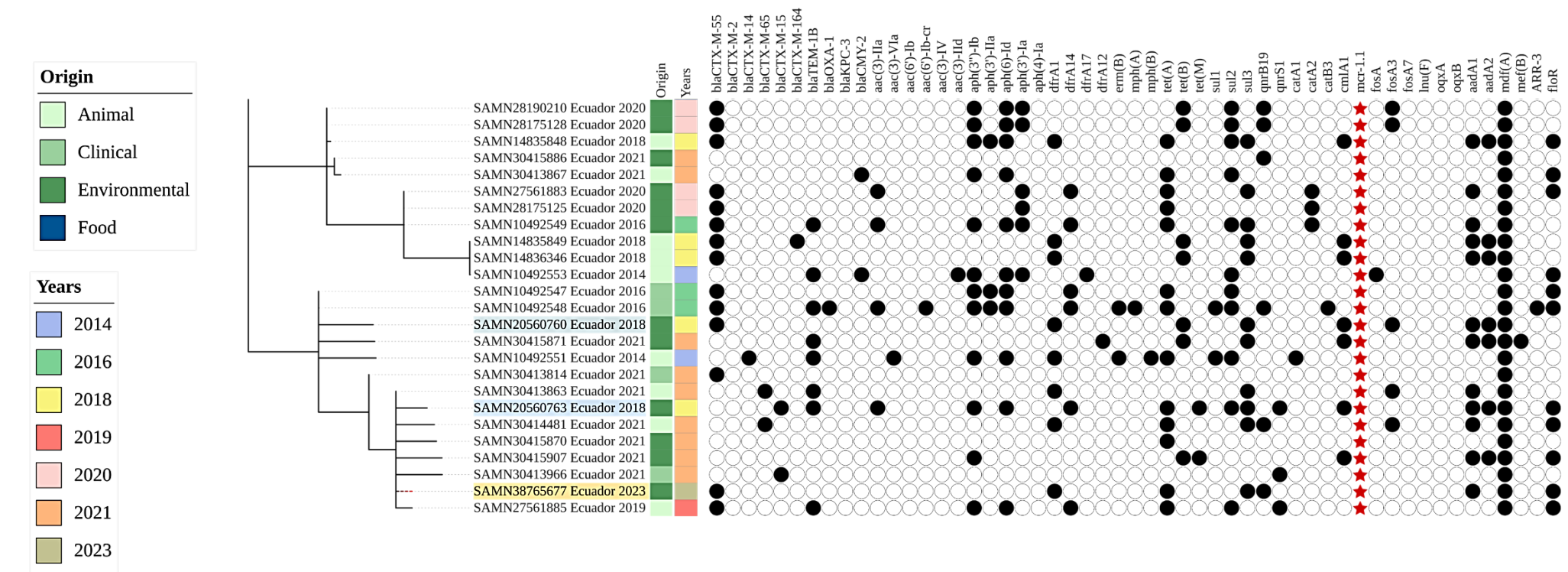
Árbol filogenético rectangular con genes de resistencia para 57 aislamientos de *E. coli* de diverso origen en comparación con la WGS de la cepa 62A. Parte I



Nota. En la parte superior de cada columna se encuentra el nombre de los genes de resistencia. Si existe la presencia de gen de resistencia en cada secuencia, el círculo está lleno de color negro; el gen marcado de color rojo en forma de estrella es el gen de interés, *mcr-1*.

Figura 11

Árbol filogenético rectangular con de genes de resistencia para 57 aislamientos de *E. coli* de diverso origen en comparación con la WGS de la cepa 62A. Parte II



Nota. En la parte superior de cada columna se encuentra el nombre de los genes de resistencia. Si existe la presencia de gen de resistencia en cada secuencia, el círculo está lleno de color negro; el gen marcado de color rojo en forma de estrella es el gen de interés, *mcr-1*. El asilamiento de color amarillo es el que contiene el gen de interés, *mcr-1*, aislado en Ecuador de origen ambiental.

En el análisis del mapa rectangular de la filogenia de la cepa *E. coli* 17A más los 149 aislamientos (ver **Figura 12, 13 y 14**), se identificó 7 ARGs de 63 genes de resistencia evaluados. Lo que indica de forma general que el aislamiento de origen ecuatoriano presentó un bajo porcentaje de ARGs (11.11%). No obstante, se destacó la presencia de aminoglucósidos acetiltransferasas ((*aac(6')-Ib-cr* y *aac(3)-lia*), β -lactamasas (*bla*_{CTX-M-15}), carbapenemasas (*bla*_{OXA-1} y *bla*_{OXA-48}), β -lactamasas tipo TEM (*bla*_{TEM-1B}) y el gen de resistencia múltiple a los antibióticos (*mdf(A)*). En consecuencia, el gen *bla*_{OXA-1} se manifestó en un 10.67% (16/150), el gen *bla*_{CTX-M-15} se encontró en alrededor del 19.33% (29/150).

En este contexto, el gen *bla*_{OXA-1} se ha asociado frecuentemente con genes que codifican β -lactamasas de espectro extendido (ESBL) y se ha sugerido que confiere resistencia a combinaciones de penicilina e inhibidores (**Livermore et al., 2019**). Por lo que, se ha descrito la asociación frecuente de *bla*_{OXA-1} con el CTX-M-15, el determinante ESBL más abundante en los aislados de *E. coli* humana, procedentes de diversos orígenes geográficos, lo que contribuye a la resistencia a las combinaciones de inhibidores de la β -lactamasas; un estudio sobre cepas clínicas analizadas en busca de ARGs de *E. coli* aisladas en Bangladesh indicó genes notables como *bla*_{OXA} (48%) y *bla*_{CTX-M-15} (32%), que están asociados con ESBL (**Jain et al., 2021**). También, en el estudio, se utilizó la secuenciación del genoma completo (WGS) para un análisis en profundidad de los patrones de resistencia; este enfoque es crucial para comprender los cambios filogenómicos y la presencia de elementos genéticos que contribuyen a la resistencia. Asimismo, en un estudio reciente se informó de una mayor prevalencia de *bla*_{CTX-M-15} (52%) entre aislados de *E. coli* productores de ESBL, causantes de infecciones extraintestinales en Bangladesh (**Mazumder et al., 2020**).

Por su lado, el gen *bla*_{OXA-48} estuvo presente en todas las secuencias de los aislamientos, en su mayoría de origen clínico (89.33%), seguido del ambiental (7.33%), y por último del origen animal (3.33%) en un 100% (150/150), debido a que es el gen de estudio. Asimismo, se identificó que el gen *mdf(A)*, se encontraba en un 100% (150/150) presente en todos los aislamientos descargados del GenBank y en la cepa *E. coli* 17A (ver **Figura 13, 14 y 15**), este gen codifica una proteína transportadora que funciona como una bomba de eflujo, que es capaz de expulsar una variedad de compuestos antibióticos y tóxicos fuera de la célula bacteriana, lo que reduce su

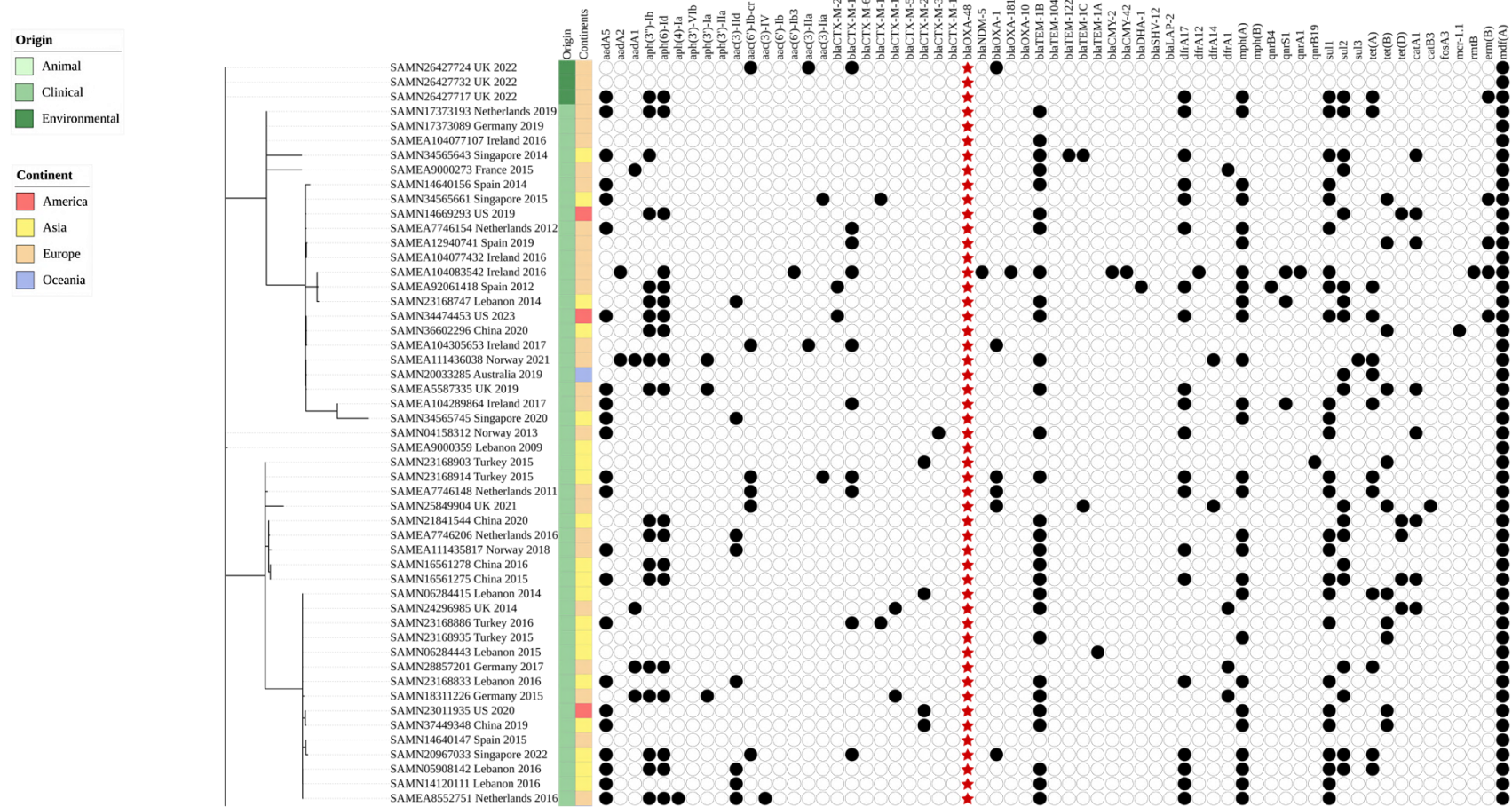
concentración intracelular y, en consecuencia, su efectividad (**Li & Ge, 2023**). Por lo que, *mdf(A)* en *E. coli* parece ser bastante común, pues en un estudio se detectaron 25 genes antimicrobianos en total, y el *mdf(A)* fue el más prevalente, encontrado en el 100% de los casos (**Lozica et al., 2022**). Igualmente, en otro estudio realizado en China, todos los aislados de *E. coli* contenían el gen *mdf(A)* de resistencia a antimicrobianos (AMR), lo que indica una alta prevalencia del gen en estas bacterias (**Zhou et al., 2022**). De la misma forma, en un análisis de secuenciación del genoma completo de *E. coli* aislado, se encontró que el gen *mdf(A)* estaba presente en todos los 14 aislados examinados (**Adzitey et al., 2019**).

Lo que corresponde a, el gen *aac(6')-Ib-cr* se expresó en un nivel relativamente bajo de 10% (15/150). No obstante, un estudio se evaluó los patrones de resistencia a los aminoglucósidos en bacterias gramnegativas, incluida *E. coli*; este gen que codifica enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AME), se encontró con una alta frecuencia (59%) entre las bacterias gramnegativas analizadas (**Azimi et al., 2022**). Asimismo, el gen *aac(3)-lia* se reflejó en un 2.67% (4/150), lo que significa que la expresión de este gen en las 150 secuencias analizadas resultó bajo. En una investigación sobre los genes de resistencia a los aminoglucósidos en el complejo *Enterobacter cloacae*, estrechamente relacionado con *E. coli*, se identificó a *aac(3)-lia*, con una prevalencia del 21,76% entre los aislados analizados (**Zhu et al., 2020**). Por último, el gen *bla_{TEM-1B}* se determinó en un 55.33% (83/150). Sin embargo, en un estudio de 39 aislados de *E. coli*, todos fueron resistentes a la ampicilina, y el 66.6% eran multirresistentes; los genes de resistencia *bla_{OXA-1}* y *bla_{TEM-1}* se detectaron en 16/39 y 6/39 aislados, respectivamente (**Vale et al., 2021**).

Por otra parte, las secuencias de los 150 aislamientos en contraste con la cepa aislada, la cepa *E. coli* 17A se originó de un mismo nodo en conjunto con el aislamiento SAMN14640107_Spain_2015 (ver **Figura 14**), lo que indica que presentan un ancestro en común. No obstante, son de diferente tipo de aislamiento y año de colección.

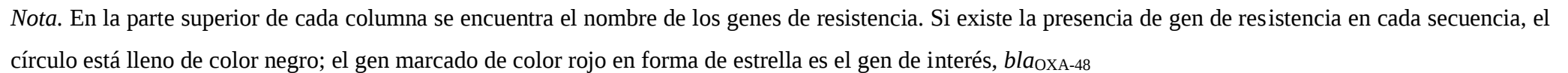
Figura 12

Árbol filogenético rectangular con de genes de resistencia para 149 aislamientos de *E. coli* de diverso origen geográfico en comparación con la WGS de la cepa 17A. Parte I

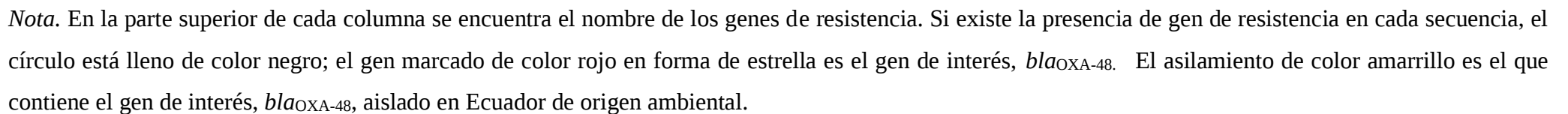


Nota. En la parte superior de cada columna se encuentra el nombre de los genes de resistencia. Si existe la presencia de gen de resistencia en cada secuencia, el círculo está lleno de color negro; el gen marcado de color rojo en forma de estrella es el gen de interés, *bla*_{OXA-48}.

Árbol filogenético rectangular con de genes de resistencia para 149 aislamientos de E. coli de diverso origen geográfico en comparación con la WGS de la cepa 17A. Parte II



Árbol filogenético rectangular con de genes de resistencia para 149 aislamientos de E. coli de diverso origen geográfico en comparación con la WGS de la cepa 17A. Parte III



CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

1) El análisis del genoma completo de *E. coli* portadoras de genes de resistencia, se logró realizar con la secuenciación de tercera generación Oxford Nanopore Technologies (ONT) con un basecalling SUP. Mediante la cual se pudo realizar una profunda caracterización, tanto de la cepa *E. coli* 62A portadora del gen *mcr-1*, como de la cepa *E. coli* 17A portadora del gen *bla_{OXA-48}*. Asimismo, se examinó todo su entorno genético en base a análisis de su comparativa con otros plásmidos que, también albergaban estos genes. Por último, se analizó los árboles filogenéticos, además se logró determinar la expresión de otros genes de resistencia presentes en las cepas y en los aislamientos descargados del GenBank, como fue el caso del gen *mdf(A)* con un 98.27% en la cepa *E. coli* 62A y un 100% en la cepa *E. coli* 17A, de igual forma se identificaron los genes de virulencia. Además, el árbol con el MLST indicó que ambas cepas contenían el ST10.

2) Las secuencias de genoma completo de *E. coli* portadoras de los genes de resistencia *mcr-1* y *bla_{OXA-48}* de origen ambiental de Ecuador utilizando secuenciación de tercera generación, se obtuvieron de una manera altamente eficiente, consiguiendo obtener por separado a las secuencias del cromosoma y de sus plásmidos. Estas cepas se las caracterizó *in silico* haciendo uso de diferentes herramientas bioinformáticas, lo cual permitió la localización de los genes de resistencia de interés; asimismo, se identificó a genes de virulencia dentro del genoma completo a nivel de plásmido y cromosoma. A la vez, la tipificación MLST obtenida mediante la plataforma MLST 2.0 de CGE determinó que el tipo de secuencia para estos dos aislamientos *E. coli* 62A y *E. coli* 17A fueron de ST10 y ST46, respectivamente.

3) El análisis del entorno genético de los genes *mcr-1* y *bla_{OXA-48}* en las secuencias de genoma completo de las cepas de *E. coli* analizadas permitió identificar en primer lugar que la cepa *E. coli* 62A presenta alta homología con el resto de secuencias de plásmidos analizadas, además se evaluó únicamente el fragmento donde se encontró

el gen *mcr-1* demostrando que el mismo mantiene una homología del 100% con el plásmido pLR-25 perteneciente a un aislamiento de Vietman, así como también una similitud del 90% con el plásmido pEC1260-*mcr* de Bangladesh. Por otro lado, en cuanto a la cepa *E. coli* 17A se identificó es la única secuencia de plásmido que el segmento superior mantiene un entorno diferente a las otras analizadas de otros países. Sin embargo, el segmento inferior presenta alta homología con los elementos genéticos expresados.

4) Al evaluar la relación filogenética del genoma completo de los aislamientos tanto de la cepa *E. coli* 62A y *E. coli* 17A con secuencias aisladas de diverso origen y localización geográfica se demostró que la cepa de *E. coli* 62A mantiene relación con siete secuencias ecuatorianas, ya que las mismas pertenecen a un mismo clado, lo que indica que comparten un mismo ancestro en común. Además, se relacionó genéticamente con el aislado SAMN20560760_Ecuador_2018 de origen ambiental compartiendo con siete de los nueve ARGs presentes en la cepa de estudio. Mientras que la cepa *E. coli* 17A, se demostró que mantiene una relación con la cepa SAMN14640107_Spain_2015 ya que comparten un ancestro en común, mientras que en cuanto a sus genes de resistencia mantiene una relación 100% idéntica a la cepa SAMN17214841_Switzerland_2021, ya que comparten los mismos siete genes de resistencia, destacando que ambas cepas pertenecen a aislados ambientales.

4.2. Recomendaciones

- Realizar una WGS complementaria de short-reads (p. ej., Illumina) para comparar con los resultados obtenidos de long-reads mediante ONT, por lo que el empleo de ensamblajes híbridos permite complementar las falencias existentes uno del otro.
- Secuenciar genomas completos de aislados de *E. coli* de diferente tipo de origen con la finalidad de comprender la diseminación en diferentes puntos geográficos e interacciones evolutivas entre ellos con los aislados de origen ambiental ecuatoriano.
- Monitorear epidemiológicamente las WGS, ya que permitirá implementar estrategias para la contención de la evolución y diseminación de los ARGs y por tanto de la RAM a nivel mundial.

C. MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias Bibliográficas

- Abavisani, M., Bostanghadiri, N., Ghahramanpour, H., Kodori, M., Akrami, F., Fathizadeh, H., Hashemi, A., & Rastegari, M. (2023). Colistin resistance mechanisms in Gram-negative bacteria: a Focus on *Escherichia coli*. In *Letters in Applied Microbiology*, 76(2). <https://doi.org/10.1093/lambio/ovad023>
- Acharya, P., & Kurosu, M. (2023). Introduction to chemotherapy: general and clinical considerations. In *Medicinal Chemistry of Chemotherapeutic Agents: A Comprehensive Resource of Anti-infective and Anti-cancer Drugs*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90575-6.00014-4>
- Adzitey, F., Assoah, P., & Teye, G. A. (2019). Whole-genome sequencing of *Escherichia coli* isolated from contaminated meat samples collected from the Northern Region of Ghana reveals the presence of multiple antimicrobial resistance genes. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 18. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.03.014>
- Afgan, E., Nekrutenko, A., Grünig, B., Blankenberg, D., Goecks, J., Schatz, M., Ostrovsky, A., Mahmoud, A., Lonie, A., Syme, A., Fouilloux, A., Bretaudeau, A., Nekrutenko, A., Kumar, A., Eschenlauer, A., Desanto, A., Guerler, A., Serrano, B., Batut, B., ... Briggs, P. (2022). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022 update. *Nucleic Acids Research*, 50(W1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkac247>
- Ahmed, S., Das, T., Islam, M., Herrero, A., Biswas, P., & Olsen, J. (2020). High prevalence of *mcr-1*-encoded colistin resistance in commensal *Escherichia coli* from broiler chicken in Bangladesh. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75608-2>
- Ahmed, S., Sony, S., Chowdhury, M., Ullah, M., Paul, S., & Hossain, T. (2020). Retention of antibiotic activity against resistant bacteria harbouring aminoglycoside-N-

- acetyltransferase enzyme by adjuvants: a combination of *in-silico* and *in-vitro* study. *Scientific reports*, 10(1), 19381. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76355-0>
- Aldea, I., Gibello, A., Hernández, M., Leekitcharoenphon, P., Bortolaia, V., & Moreno, M. (2022). Clonal and plasmid-mediated flow of ESBL/AmpC genes in *Escherichia coli* in a commercial laying hen farm. *Veterinary Microbiology*, 270. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2022.109453>
- Alhaji, N., Odetokun, I., Adamu, A., Hassan, A., Lawan, M., & Fasina, F. (2023). Antimicrobial usage and associated residues and resistance emergence in smallholder beef cattle production systems in Nigeria: A One Health challenge. *Veterinary Research Communications*, 47(1). <https://doi.org/10.1007/s11259-022-09944-1>
- Andersson, D., Balaban, N., Baquero, F., Courvalin, P., Glaser, P., Gophna, U., Kishony, R., Molin, S., & Tønjum, T. (2021). Antibiotic resistance: Turning evolutionary principles into clinical reality. In *FEMS Microbiology Reviews*, 44(2). <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUAA001>
- Armstrong, T., Fenn, S., & Hardie, K. (2021). JMM Profile: Carbapenems: a broad-spectrum antibiotic. *Journal of Medical Microbiology*, 70(12). <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001462>
- Arnold, B., Huang, I., & Hanage, W. (2022). Horizontal gene transfer and adaptive evolution in bacteria. In *Nature Reviews Microbiology*, 20(4). <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00650-4>
- Asokan, G., Ramadhan, T., Ahmed, E., & Sanad, H. (2019). WHO global priority pathogens list: A bibliometric analysis of medline-pubmed for knowledge mobilization to infection prevention and control practices in Bahrain. In *Oman Medical Journal*, 34(3). <https://doi.org/10.5001/omj.2019.37>
- Athanasopoulou, K., Boti, M., Adamopoulos, P., Skourou, P., & Scorilas, A. (2022). Third-generation sequencing: The spearhead towards the radical transformation of modern genomics. *Life*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/life12010030>

- Auta, A., Hadi, M., Oga, E., Adewuyi, E., Abdu, S., Adeloye, D., Strickland, B., & Morgan, D. (2019). Global access to antibiotics without prescription in community pharmacies: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection*, 78(1). <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2018.07.001>
- Azimi, L., Armin, S., Samadi, H., Abdollahi, N., Ghazvini, K., Hasanzadeh, S., Shahraki Zahedani, S., Rafiei Tabatabaei, S., & Fallah, F. (2022). Evaluation of phenotypic and genotypic patterns of aminoglycoside resistance in the Gram-negative bacteria isolates collected from pediatric and general hospitals. *Molecular and Cellular Pediatrics*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s40348-022-00134-2>
- Baquero, F., & Levin, B. (2021). Proximate and ultimate causes of the bactericidal action of antibiotics. In *Nature Reviews Microbiology*, 19(2). <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00443-1>
- Bastidas, C., Guerrero, S., Ortuño, N., Sunyoto, T., Gomes, C., Ramírez, M., Calero, W., Harries, A., Rey, J., de Waard, J., & Calvopiña, M. (2023). Colistin resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in humans and backyard animals in Ecuador. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 47, 1–8. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2023.48>
- Beckett, A., Cook, F., & Samuel, C. (2021). What has biochemistry done for us ? A pandemic in the age of next- generation sequencing. *The Biochemist*, 10(15).
- Behera, M., Parmanand, Roshan, M., Rajput, S., Gautam, D., Vats, A., Ghorai, S., & De, S. (2023). Novel *aadA5* and *dfrA17* variants of class 1 integron in multidrug-resistant *Escherichia coli* causing bovine mastitis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(1). <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12304-3>
- Bobate, S., Mahalle, S., Dafale, N., & Bajaj, A. (2023). Emergence of environmental antibiotic resistance: Mechanism, monitoring and management. In *Environmental Advances*, 13. <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2023.100409>
- Boonyasiri, A., Brinkac, L., Jauneikaite, E., White, R., Greco, C., Seenama, C., Tangkoskul, T., Nguyen, K., Fouts, D., & Thamlikitkul, V. (2023). Characteristics and genomic epidemiology of colistin-resistant *Enterobacterales* from farmers, swine, and

- hospitalized patients in Thailand, 2014–2017. *BMC Infectious Diseases*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-023-08539-8>
- Boueroy, P., Wongsurawat, T., Jenjaroenpun, P., Chopjitt, P., Hatrongjit, R., Jittapalapong, S., & Kerdsin, A. (2022). Plasmidome in *mcr-1* harboring carbapenem-resistant *Enterobacterales* isolates from human in Thailand. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21836-7>
- Browning, D., Hobman, J., & Busby, S. (2023). Laboratory strains of *Escherichia coli* K-12: things are seldom what they seem. *Microbial genomics*, 9(2), mgen000922. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000922>
- Bruner, R., Bojanski, M., Hogan, S., & Shepherdson, W. (2023). Penicillin: The Miracle Drug. *SSRN Electronic Journal*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4321087>
- Calero, W., Rodríguez, K., Medina, A., Medina, J., Ortuño, N., Sunyoto, T., Dias, C., Bastidas, C., Ramírez, M., & Harries, A. (2023). Genomic insights of *mcr-1* harboring *Escherichia coli* by geographical region and a One-Health perspective. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1032753>
- Callaway, T., Lillehoj, H., Chuanchuen, R., & Gay, C. (2021). Alternatives to antibiotics: A symposium on the challenges and solutions for animal health and production. *Antibiotics*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050471>
- Carattoli, A., & Hasman, H. (2020). PlasmidFinder and In Silico pMLST: Identification and Typing of Plasmid Replicons in Whole-Genome Sequencing (WGS). In *Methods in Molecular Biology*, 2075. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9877-7_20
- Cavaillon, J., & Legout, S. (2022). Louis Pasteur: Between Myth and Reality. In *Biomolecules*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/biom12040596>
- Center for Disease Control and Prevention. (2019). Antibiotic resistance threats in the United States, 2019, Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services. *Center for Disease Control and Prevention*. <http://dx.doi.org/10.15620/cdc:82532>
- Center for Genomic Epidemiology. (2022). *MLST 2.0*. <https://cge.food.dtu.dk/services/MLST/>

- Chen, C., Hou, J., Tanner, J., & Cheng, J. (2020). Bioinformatics methods for mass spectrometry-based proteomics data analysis. *In International Journal of Molecular Sciences*, 21(8). <https://doi.org/10.3390/ijms21082873>
- Chinemerem, D., Ugwu, M., Oliselo, C., Al, M., Chinedu, J., Victor, U., & Saki, M. (2022). Antibiotic resistance: The challenges and some emerging strategies for tackling a global menace. *In Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(9). <https://doi.org/10.1002/jcla.24655>
- Ciaravolo, V., Scaloni, A., Novi, G., Renzone, G., & Arena, S. (2023). Proteomic Characterization of Native and Rearranged Disulfide Bonds in Proteins from Thermally Treated and Commercial Milk Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(26). <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c01689>
- Cifuentes, S., Graham, J., Loayza, F., Saraiva, C., Salinas, L., Trueba, G., & Cárdenas, P. (2022). Evaluation of changes in the faecal resistome associated with children's exposure to domestic animals and food animal production. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 31. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2022.09.009>
- Ćwiek, K., Biel, A., Karwańska, M., Siedlecka, M., Lammens, C., Rebelo, A., Hendriksen, R., Kuczkowski, M., Chmielewska, M., & Wieliczko, A. (2021). Phenotypic and genotypic characterization of *mcr-1*-positive multidrug-resistant *Escherichia coli* ST93, ST117, ST156, ST10, and ST744 isolated from poultry in Poland. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(3). <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00538-8>
- Dadgostar, P. (2019). Antimicrobial resistance: implications and costs. *In Infection and Drug Resistance*, 12. <https://doi.org/10.2147/IDR.S234610>
- Darphorn, T., Brul, S., & ter Kuile, B. (2022). Genetic editing of multi-resistance plasmids in *Escherichia coli* isolated from meat during transfer. *Plasmid*, 122. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2022.102640>
- Dash, H., & Das, S. (2022). Microbial community signatures for estimation of postmortem time intervals. *In Advances in Applied Microbiology*, 118. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2022.02.002>

- de Koning, W., Miladi, M., Hiltemann, S., Heikema, A., Hays, J., Flemming, S., van den Beek, M., Mustafa, D., Backofen, R., Grüning, B., & Stubbs, A. (2020). NanoGalaxy: Nanopore long-read sequencing data analysis in Galaxy. *GigaScience*, 9(10). <https://doi.org/10.1093/GIGASCIENCE/GIAA105>
- de los Santos, E., Laviña, M., & Poey, M. (2021). Strict relationship between class 1 integrons and resistance to sulfamethoxazole in *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*, 161. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105206>
- Delahaye, C., & Nicolas, J. (2021). Sequencing DNA with nanopores: Troubles and biases. *PLOS ONE*, 16(10), e0257521. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0257521>
- Deuber, R., Leisinger, U., & Bartsch, A. (2021). Sulfa-drugs as topic for secondary school chemistry - effects, side effects and structural causes. *Chimia*, 75(1–2). <https://doi.org/10.2533/chimia.2021.80>
- Dhindwal, P., Myziuk, I., & Ruzzini, A. (2023). Macrolide esterases: current threats and opportunities. In *Trends in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2023.08.008>
- Dhingra, S., Rahman, N., Peile, E., Rahman, M., Sartelli, M., Hassali, M., Islam, T., Islam, S., & Haque, M. (2020). Microbial Resistance Movements: An Overview of Global Public Health Threats Posed by Antimicrobial Resistance, and How Best to Counter. In *Frontiers in Public Health*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.535668>
- Di Francesco, A., Salvatore, D., Sakhria, S., Catelli, E., Lupini, C., Abbassi, M., Bessoussa, G., Ben, S., & Ben, N. (2021). High frequency and diversity of tetracycline resistance genes in the microbiota of broiler chickens in Tunisia. *Animals*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/ani11020377>
- Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica. (2018). Instituto Nacional De Investigación En Salud Pública Reporte De Datos De Resistencia A Los Antimicrobianos En Ecuador 2014-2018. *Ministerio de Salud Pública*, 2(1).
- Durand, G., Raoult, D., & Dubourg, G. (2019). Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. In *International Journal of Antimicrobial Agents*, 53(4). <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.11.010>

- Dutescu, I., & Hillie, S. (2021). Encouraging the development of new antibiotics: Are financial incentives the right way forward? A systematic review and case study. *Infection and Drug Resistance*, 14. <https://doi.org/10.2147/IDR.S287792>
- Egorov, A., Ulyashova, M., & Rubtsova, M. (2018). Bacterial enzymes and antibiotic resistance. *In Acta Naturae*, 10(4). <https://doi.org/10.32607/20758251-2018-10-4-33-48>
- Ewers, C., Göpel, L., Prenger E., Semmler, T., Kerner, K., & Bauerfeind, R. (2022). Occurrence of *mcr-1* and *mcr-2* colistin resistance genes in porcine *Escherichia coli* isolates (2010–2020) and genomic characterization of *mcr-2*-positive *E. coli*. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1076315>
- Faleye, A., Adegoke, A., Ramluckan, K., Fick, J., Bux, F., & Stenström, T. (2019). Concentration and reduction of antibiotic residues in selected wastewater treatment plants and receiving waterbodies in Durban, South Africa. *Science of the Total Environment*, 678. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.410>
- Fanelli, G., Pasqua, M., Prosseda, G., Grossi, M., & Colonna, B. (2023). *AcrAB* efflux pump impacts on the survival of adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 inside macrophages. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29817-0>
- Feng, C., Gao, M., Jiang, W., Shi, W., Li, A., Liu, S., Zhang, L., Zhang, X., Li, Q., Lin, H., Lu, J., Li, K., Zhang, H., Hu, Y., Bao, Q., & Lin, X. (2022). Identification of a novel aminoglycoside O-nucleotidyltransferase *AadA33* in *Providencia vermicola*. *Frontiers in microbiology*, 13, 990739. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.990739>
- Firmo, E., Oliveira, J., Scavuzzi, A., Alves, L., Brayner, F., Veras, D., & Lopes, A. de S. (2020). *In vitro* activity of polymyxin B in combination with meropenem, amikacin and gentamicin against *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates co-harboring aminoglycoside-modifying enzymes, *bla*_{NDM-1} and *bla*_{KPC-2}. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 22. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.04.014>
- Florensa, A., Kaas, R., Clausen, P., Aytan, D., & Aarestrup, F. (2022). ResFinder – an open online resource for identification of antimicrobial resistance genes in next-generation

- sequencing data and prediction of phenotypes from genotypes. *Microbial Genomics*, 8(1). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000748>
- Freed, N., Vlková, M., Faisal, M., & Silander, O. (2021). Rapid and inexpensive whole-genome sequencing of SARS-CoV-2 using 1200 bp tiled amplicons and Oxford Nanopore Rapid Barcoding. *Biology methods & protocols*, 5(1), bpaa014. <https://doi.org/10.1093/biomethods/bpaa014>
- Gogry, F., Siddiqui, M., Sultan, I., & Haq, Q. (2021). Current Update on Intrinsic and Acquired Colistin Resistance Mechanisms in Bacteria. *Frontiers in medicine*, 8, 677720. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.677720>
- Goldstein, S., Beka, L., Graf, J., & Klassen, J. (2019). Evaluation of strategies for the assembly of diverse bacterial genomes using MinION long-read sequencing. *BMC genomics*, 20(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5381-7>
- Goulas, A., Belhadi, D., Descamps, A., Andreumont, A., Benoit, P., Courtois, S., Dagot, C., Grall, N., Makowski, D., Nazaret, S., Nélieu, S., Patureau, D., Petit, F., Roose-Amsaleg, C., Vittecoq, M., Livoreil, B., & Laouénan, C. (2020). How effective are strategies to control the dissemination of antibiotic resistance in the environment? A systematic review. *In Environmental Evidence*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13750-020-0187-x>
- Grant, J., Enns, E., Marinier, E., Mandal, A., Herman, E., Chen, C., Graham, M., Van Domselaar, G., & Stothard, P. (2023). Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 51(W1), W484–W492. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAD326>
- Gu, X., Zheng, M., Chen, L., & Li, H. (2022). The development of New Delhi metallo- β -lactamase-1 inhibitors since 2018. *In Microbiological Research*, 261. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127079>
- Gülbudak, H., Öztürk, C., Kuyugöz, S., & Tezcan Ülger, S. (2021). *Pneumocystis jirovecii* İzolatlarının Dihidropteroat Sentaz (DHPS) Gen Mutasyonları ve Mitokondriyal Büyük Alt Birim (mtLSU) rRNA Genotip Varyasyonlarının Belirlenmesi [Dihydropteroate Synthase (DHPS) Gene Mutations and Mitochondrial Large Subunit

(mtLSU) rRNA Genotype Variations in *Pneumocystis jirovecii* Strains]. *Mikrobiyoloji bulteni*, 55(1), 41–52. <https://doi.org/10.5578/mb.20140>

Haenni, M., Dagot, C., Chesneau, O., Bibbal, D., Labanowski, J., Vialette, M., Bouchard, D., Martin-Laurent, F., Calsat, L., Nazaret, S., Petit, F., Pourcher, A., Togola, A., Bachelot, M., Topp, E., & Hocquet, D. (2022). Environmental contamination in a high-income country (France) by antibiotics, antibiotic-resistant bacteria, and antibiotic resistance genes: Status and possible causes. *In Environment International*, 159. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.107047>

Hassoun, N., Stabholz, Y., Kreft, J., de la Cruz, R., Romalde, J., Nesme, J., Sørensen, S., Smets, B., Graham, D., & Paul, M. (2020). Comparison of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes abundance in hospital and community wastewater: A systematic review. *In Science of the Total Environment*, 743. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140804>

Hendrickx, A., Landman, F., de Haan, A., Borst, D., Witteveen, S., van Santen-Verheuevel, M., Schouls, L. M., Maijer, A., Hall, M., Kluytmans, J., Spijkerman, I., van Dijk, K., Halaby, T., Zwart, B., Diederens, B., Voss, A., Dorigo, J., Notermans, D., Ott, A., ... Stals, F (2020). *bla*_{OXA-48} genome architecture among carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in the Netherlands. *In bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.12.18.423568>

Hoang, H., Yamamoto, M., Calvopina, M., Bastidas, C., Khong, D., Nguyen, T., Kawahara, R., Yamaguchi, T., & Yamamoto, Y. (2023). Comparative genome analysis of colistin-resistant *Escherichia coli* harboring *mcr* isolated from rural community residents in Ecuador and Vietnam. *PLOS ONE*, 18, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0293940>

Houston, S., Schovanek, E., Conway, K., Mustafa, S., Gomez, A., Ramaswamy, R., Haimour, A., Boulanger, M., Reynolds, L., & Cameron, C. (2022). Identification and Functional Characterization of Peptides with Antimicrobial Activity from the *Syphilis Spirochete*, *Treponema pallidum*. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.888525>

- Hozzari, A., Behzadi, P., Kerishchi, P., Sholeh, M., & Sabokroo, N. (2020). Clinical cases, drug resistance, and virulence genes profiling in Uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of applied genetics*, 61(2), 265–273. <https://doi.org/10.1007/s13353-020-00542-y>
- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., & Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*, 82(11). <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>
- Hu, X., Chen, Y., Xu, H., Qiao, J., Ge, H., Liu, R., & Zheng, B. (2023). Genomic epidemiology and transmission characteristics of *mcr1*-positive colistin-resistant *Escherichia coli* strains circulating at natural environment. *Science of the Total Environment*, 882. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163600>
- Hua, Y., Dai, X., Xu, Y., Xing, G., Liu, H., Lu, T., Chen, Y., & Zhang, Y. (2022). Drug repositioning: Progress and challenges in drug discovery for various diseases. *In European Journal of Medicinal Chemistry*, 234. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114239>
- Huang, J., Lv, C., Li, M. (2024). Carbapenem-resistant *Escherichia coli* exhibit diverse spatiotemporal epidemiological characteristics across the globe. *Commun Biol* 7, 51. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05745-7>
- Hubeny, J., Buta, M., Zieliński, W., Harnisz, M., Korzeniewska, E., Nowrotek, M., & Płaza, G. (2019). The prevalence of *tet(A)* and *tet(M)* tetracycline resistance genes in municipal wastewater. *Journal of Ecological Engineering*, 20(10). <https://doi.org/10.12911/22998993/112714>
- Huijbers, P., Flach, C., & Larsson, D. (2019). A conceptual framework for the environmental surveillance of antibiotics and antibiotic resistance. *Environment International*, 130. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.05.074>
- Hussein, N., AL, I., Taha, B., & Hussein, J. (2021). Mobilized colistin resistance (*mcr*) genes from 1 to 10: a comprehensive review. *In Molecular Biology Reports*, 48(3). <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06307-y>

- Hutchings, M., Truman, A., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *In Current Opinion in Microbiology*, 51. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
- Impey, R., Hawkins, D., Sutton, J., & Soares da Costa, T. (2020). Overcoming intrinsic and acquired resistance mechanisms associated with the cell wall of Gram-negative bacteria. *In Antibiotics*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090623>
- Iyer, L., Burroughs, A., Anand, S., de Souza, R., & Aravind, L. (2017). Polyvalent proteins, a pervasive theme in the intergenomic biological conflicts of bacteriophages and conjugative elements. *Journal of Bacteriology*, 199(15). <https://doi.org/10.1128/JB.00245-17>
- Jahantigh, M., Samadi, K., Dizaji, R., & Salari, S. (2020). Antimicrobial resistance and prevalence of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* isolated from lesions of colibacillosis in broiler chickens in Sistan, Iran. *BMC Veterinary Research*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02488-z>
- Jain, P., Bepari, A., Sen, P., Rafe, T., Imtiaz, R., Hossain, M., & Reza, H. (2021). High prevalence of multiple antibiotic resistance in clinical *E. coli* isolates from Bangladesh and prediction of molecular resistance determinants using WGS of an XDR isolate. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02251-w>
- Jalili, V., Afgan, E., Gu, Q., Clements, D., Blankenberg, D., Goecks, J., Taylor, J., & Nekrutenko, A. (2021). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2020 update. *Nucleic Acids Research*, 48(W1). <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA434>
- Jangir, P., Ogunlana, L., Szili, P., Czikkely, M., Shaw, L., Stevens, E., Yu, Y., Yang, Q., Wang, Y., Pál, C., Walsh, T., & MacLean, C. (2023). The evolution of colistin resistance increases bacterial resistance to host antimicrobial peptides and virulence. *eLife*, 12. <https://doi.org/10.7554/eLife.84395>
- Jarocki, V., Reid, C., Chapman, T., & Djordjevic, S. (2020). *Escherichia coli* ST302: Genomic Analysis of Virulence Potential and Antimicrobial Resistance Mediated by Mobile Genetic Elements. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03098>

- Jenkins, C., Wallis, R., Allcock, N., Barnes, K., Richards, M., Auty, J., Galyov, E., Harding, S., & Mukamolova, G. (2019). The lytic transglycosylase, LtgG, controls cell morphology and virulence in *Burkholderia pseudomallei*. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47483-z>
- Jerez, G. & Lagla, N. (2023). *Evaluación de la presencia de genes de resistencia a carbapenémicos, tigeciclina y colistina mediada por plásmidos en aislados de Escherichia coli procedentes del río Cutuchi y del canal Latacunga-Salcedo-Ambato* [Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Ambato]. Repositorio Institucional - Universidad Técnica de Ambato.
- Jian, Z., Zeng, L., Xu, T., Sun, S., Yan, S., Yang, L., Huang, Y., Jia, J., & Dou, T. (2021). Antibiotic resistance genes in bacteria: Occurrence, spread, and control. *In Journal of Basic Microbiology*, 61(12). <https://doi.org/10.1002/jobm.202100201>
- Jiang, H., Cheng, H., Liang, Y., Yu, S., Yu, T., Fang, J., & Zhu, C. (2019). Diverse Mobile Genetic Elements and Conjugal Transferability of Sulfonamide Resistance Genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in *Escherichia coli* Isolates from *Penaeus vannamei* and Pork from Large Markets in Zhejiang, China. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01787>
- Jiang, Y., Zhang, Y., Lu, J., Wang, Q., Cui, Y., Wang, Y., Quan, J., Zhao, D., Du, X., Liu, H., Li, X., Wu, X., Hua, X., Feng, Y., & Yu, Y. (2020). Clinical relevance and plasmid dynamics of *mcr-1*-positive *Escherichia coli* in China: a multicentre case-control and molecular epidemiological study. *The Lancet Microbe*, 1(1). [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30001-X](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30001-X)
- Johnson, S. (2021). *How humanity gave itself an extra life*. The New York Times Magazine. <https://www.nytimes.com/2021/04/27/magazine/global-life-span.html>
- Jurénas, D., Fraikin, N., Goormaghtigh, F., & Van, L. (2022). Biology and evolution of bacterial toxin-antitoxin systems. *Nature reviews. Microbiology*, 20(6), 335–350. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00661-1>

- Jurkowski, T. (2020). Technologies and applications for the assessment of 5-hydroxymethylcytosine. *Epigenetics Methods*, 261–278. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819414-0.00013-6>
- Kaderabkova, N., Bharathwaj, M., Furniss, R., Gonzalez, D., Palmer, T., & Mavridou, D. (2022). The biogenesis of β -lactamase enzymes. In *Microbiology (United Kingdom)*, 168(8). <https://doi.org/10.1099/mic.0.001217>
- Kalantari, M., Sharifiyazdi, H., Asasi, K., & Abdi, B. (2021). High incidence of multidrug resistance and class 1 and 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from broiler chickens in south of Iran. *Veterinary Research Forum*, 12(1). <https://doi.org/10.30466/vrf.2019.96366.2309>
- Kamal, S., Cimdins, A., Lee, C., Li, F., Martín-Rodríguez, A., Seferbekova, Z., Afasizhev, R., Wami, H., Katikaridis, P., Meins, L., Lünsdorf, H., Dobrindt, U., Mogk, A., & Römling, U. (2021). A recently isolated human commensal *Escherichia coli* ST10 clone member mediates enhanced thermotolerance and tetrathionate respiration on a P1 phage-derived IncY plasmid. *Molecular Microbiology*, 115(2). <https://doi.org/10.1111/mmi.14614>
- Kanj, S., Bassetti, M., Kiratisin, P., Rodrigues, C., Villegas, M., Yu, Y., & van Duin, D. (2022). Clinical data from studies involving novel antibiotics to treat multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. In *International Journal of Antimicrobial Agents*, 60(3). <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2022.106633>
- Katongole, P., Nalubega, F., Florence, N., Asiimwe, B., & Andia, I. (2020). Biofilm formation, antimicrobial susceptibility and virulence genes of Uropathogenic *Escherichia coli* isolated from clinical isolates in Uganda. *BMC Infectious Diseases*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05186-1>
- Kishida, K., Bosserman, R., Harb, L., Khara, P., Song, L., Hu, B., Zeng, L., & Christie, P. (2022). Contributions of F-specific subunits to the F plasmid-encoded type IV secretion system and F pilus. *Molecular Microbiology*, 117(5). <https://doi.org/10.1111/mmi.14908>

- Larsson, D., & Flach, C. (2022). Antibiotic resistance in the environment. *In Nature Reviews Microbiology*, 20(5), pp. 257–269. Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>
- Lei, C., Zhang, Y., Wang, Y., & Wang, H. (2020). Detection of mobile colistin resistance gene *mcr-10.1* in a conjugative plasmid from *Enterobacter roggenkampii* of chicken origin in China. *In Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(10). <https://doi.org/10.1128/AAC.01191-20>
- Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive tree of life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W293–W296. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB301>
- Lewis, K. (2020). The Science of Antibiotic Discovery. *In Cell*, 181(1). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.056>
- Li, W., & Zhang, G. (2022). Detection and various environmental factors of antibiotic resistance gene horizontal transfer. *In Environmental Research*, 212. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113267>
- Li, W., Guo, H., Gao, Y., Yang, X., Li, R., Li, S., Sun, C., Du, W., Chen, S., Xu, P., Huang, W., Shi, J., Yi, X., & Li, X. (2022). Comparative genomic analysis of plasmids harboring *bla_{OXA-48}*-like genes in *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1082813>
- Li, Y., & Ge, X. (2023). Molecular Dynamics Investigation of MFS Efflux Pump MdfA Reveals an Intermediate State between Its Inward and Outward Conformations. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1). <https://doi.org/10.3390/ijms24010356>
- Life Technologies. (2013). PureLink® Genomic DNA Kits For purification of genomic DNA. *Invitrogen by Life Technologies*, 25.
- Lin, B., Hui, J., & Mao, H. (2021). Nanopore technology and its applications in gene sequencing. *In Biosensors*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/bios11070214>

- Lin, B., Hui, J., & Mao, H. (2021). Nanopore technology and its applications in gene sequencing. *Biosensors*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/bios11070214>
- Lin, Y., Kuroda, M., Suzuki, S., & Mu, J. (2021). Emergence of the *mcr-1* colistin resistance gene in extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 24. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.12.024>
- Lin, Y., Xu, X., Maróti, G., Strube, M., & Kovács, Á. (2022). Adaptation and phenotypic diversification of *Bacillus thuringiensis* biofilm are accompanied by fuzzy spreader morphotypes. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41522-022-00292-1>
- Liu, Z., Jiang, W., Kim, C., Peng, X., Fan, C., Wu, Y., Xie, Z., & Peng, F. (2023). A *Pseudomonas* Lysogenic Bacteriophage Crossing the Antarctic and Arctic, Representing a New Genus of *Autographiviridae*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8). <https://doi.org/10.3390/ijms24087662>
- Liu, Z., Liu, Y., Xi, W., Liu, S., Liu, J., Mu, H., Chen, B., He, H., Fan, Y., Ma, W., Zhang, W., Fu, M., Wang, J., & Song, X. (2021). Genetic Features of Plasmid- and Chromosome-Mediated *mcr-1* in *Escherichia coli* Isolates from Animal Organs with Lesions. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.707332>
- Livermore, D., Day, M., Cleary, P., Hopkins, K., Toleman, M., Wareham, D., Wiuff, C., Doumith, M., & Woodford, N. (2019). OXA-1 β -lactamase and non-susceptibility to penicillin/ β -lactamase inhibitor combinations among ESBL-producing *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(2). <https://doi.org/10.1093/jac/dky453>
- Long, H., Feng, Y., Ma, K., Liu, L., McNally, A., & Zong, Z. (2019). The co-transfer of plasmid-borne colistin-resistant genes *mcr-1* and *mcr-3.5*, the carbapenemase gene *bla_{NDM-5}* and the 16S methylase gene *rmtB* from *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37125-1>
- Lozica, L., Villumsen, K., Li, G., Hu, X., Maurić, M., & Gottstein, Ž. (2022). Genomic Analysis of *Escherichia coli* Longitudinally Isolated from Broiler Breeder Flocks after

- the Application of an Autogenous Vaccine. *Microorganisms*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020377>
- Luo, X., & Matthews, K. (2023). The conjugative transfer of plasmid-mediated mobile colistin resistance gene, *mcr-1*, to *Escherichia coli* O157:H7 and *Escherichia coli* O104:H4 in nutrient broth and in mung bean sprouts. *Food Microbiology*, 111. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104188>
- MacKenzie, M., & Argyropoulos, C. (2023). An Introduction to Nanopore Sequencing: Past, Present, and Future Considerations. *Micromachines* 2023, 14(2), 459. <https://doi.org/10.3390/MI14020459>
- Magieiros, L., Méric, G., Bayliss, S., Pensar, J., Pascoe, B., Mourkas, E., Calland, J., Yahara, K., Murray, S., Wilkinson, T., Williams, L., Hitchings, M., Porter, J., Kemmett, K., Feil, E., Jolley, K., Williams, N., Corander, J., & Sheppard, S. (2021). Genome evolution and the emergence of pathogenicity in avian *Escherichia coli*. *Nature communications*, 12(1), 765. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-20988-w>
- Mahazu, S., Sato, W., Ayibieke, A., Prah, I., Hayashi, T., Suzuki, T., Iwanaga, S., Ablordey, A., & Saito, R. (2022). Insights and genetic features of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolates from two hospitals in Ghana. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05869-6>
- Malchione, M., Torres, L., Hartley, D., Koch, M., & Goodman, J. (2019). Carbapenem and colistin resistance in *Enterobacteriaceae* in Southeast Asia: Review and mapping of emerging and overlapping challenges. In *International Journal of Antimicrobial Agents*, 54(4). <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.07.019>
- Mancuso, G., Midiri, A., Gerace, E., & Biondo, C. (2021). Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens. In *Pathogens*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/pathogens10101310>
- Mann, A., Nehra, K., Rana, J., & Dahiya, T. (2021). Antibiotic resistance in agriculture: Perspectives on upcoming strategies to overcome upsurge in resistance. *Current Research in Microbial Sciences*, (2). <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100030>

- Martínez, S., Sanz, S., Olarte, C., Hidalgo, R., Carvalho, I., Fernández, R., Campaña, A., Latorre, J., Zarazaga, M., & Torres, C. (2022). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* from the Broiler Farm Environment, with Detection of SHV-12-Producing Isolates. *Antibiotics*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040444>
- Mazumder, R., Abdullah, A., Ahmed, D., & Hussain, A. (2020). High prevalence of *bla*_{CTX-M-15} gene among extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates causing extraintestinal infections in bangladesh. *Antibiotics*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110796>
- Miethke, M., Pieroni, M., Weber, T., Brönstrup, M., Hammann, P., Halby, L., Arimondo, P. B., Glaser, P., Aigle, B., Bode, H., Moreira, R., Li, Y., Luzhetskyy, A., Medema, M. H., Pernodet, J., Stadler, M., Tormo, J., Genilloud, O., Truman, A., ... Müller, R. (2021). Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics. In *Nature Reviews Chemistry*, 5(10). <https://doi.org/10.1038/s41570-021-00313-1>
- Migura, L., González, J., Martinez, J., Aguirre, J., Moreno, A., Perez de Rozas, A., Höfle, U., Ramiro, Y., & Gonzalez, N. (2020). *mcr*-Colistin Resistance Genes Mobilized by IncX4, IncHI2, and IncI2 Plasmids in *Escherichia coli* of Pigs and White Stork in Spain. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03072>
- Montero, L., Irazabal, J., Cardenas, P., Graham, J., & Trueba, G. (2021). Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing-*Escherichia coli* Isolated from Irrigation Waters and Produce in Ecuador. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.709418>
- Moussa, J., Panossian, B., Nassour, E., Salloum, T., Abboud, E., & Tokajian, S. (2020). Detailed characterization of an IncFII plasmid carrying *bla*_{OXA-48} from Lebanon. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(9). <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa181>
- Mu, X., Gao, R., Xiao, W., Gao, Q., Cao, C., Xu, H., Gao, S., & Liu, X. (2020). *EntE*, *EntS* and *TolC* synergistically contributed to the pathogenesis of APEC strain E058. *Microbial Pathogenesis*, 141. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.103990>
- Munk, P., Brinch, C., Møller, F., Petersen, T., Hendriksen, R., Seyfarth, A., Kjeldgaard, J., Svendsen, C., van Bunnik, B., Berglund, F., Bego, A., Power, P., Rees, C.,

- Lambrinidis, D., Neilson, E., Gibb, K., Coventry, K., Collignon, P., Cassar, S., ... Aarestrup, F. (2022). Genomic analysis of sewage from 101 countries reveals global landscape of antimicrobial resistance. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34312-7>
- Nadimpalli, M., Marks, S., Montealegre, M., Gilman, R., Pajuelo, M., Saito, M., Tsukayama, P., Njenga, S., Kiiru, J., Swarthout, J., Islam, M., Julian, T., & Pickering, A. (2020). Urban informal settlements as hotspots of antimicrobial resistance and the need to curb environmental transmission. *In Nature Microbiology*, 5(6). <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0722-0>
- Nang, S., Li, J., & Velkov, T. (2019). The rise and spread of *mcr* plasmid-mediated polymyxin resistance. *In Critical Reviews in Microbiology*, 45(2). <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1492902>
- O'Rourke, A., Beyhan, S., Choi, Y., Morales, P., Chan, A., Espinoza, J., Dupont, C., Meyer, K., Spoering, A., Lewis, K., Nierman, W., & Nelson, K. (2020). Mechanism-of-action classification of antibiotics by global transcriptome profiling. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(3). <https://doi.org/10.1128/AAC.01207-19>
- Olawoye, I., Frost, S., & Happi, C. (2020). The Bacteria Genome Pipeline (BAGEP): an automated, scalable workflow for bacteria genomes with Snakemake. *PeerJ*, 8, e10121. <https://doi.org/10.7717/peerj.10121>
- Ondon, B., Li, S., Zhou, Q., & Li, F. (2021). Sources of Antibiotic Resistant Bacteria (ARB) and Antibiotic Resistance Genes (ARGs) in the Soil: A Review of the Spreading Mechanism and Human Health Risks. *In Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 256. https://doi.org/10.1007/398_2020_60
- Osińska, A., Korzeniewska, E., Harnisz, M., Felis, E., Bajkacz, S., Jachimowicz, P., Niestępski, S., & Konopka, I. (2020). Small-scale wastewater treatment plants as a source of the dissemination of antibiotic resistance genes in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 381. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121221>
- Oxford Nanopore Technologies. (2013). Nanopore Sequencing Accuracy. <https://nanoporetech.com/accuracy>

- Pachanon, R., Koide, K., Kongsoi, S., Nakajima, C., Kapalamula, T., Suthienkul, O., & Suzuki, Y. (2020). Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein *QnrB19* with *Salmonella Typhimurium* DNA gyrase. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 26(11). <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2020.06.002>
- Pai, J. (2021). Gerhard Domagk Discovers Chemotherapy. *The Journal of the Association of Physicians of India*, 69(4).
- Palma, F., Mangone, I., Janowicz, A., Moura, A., Chiaverini, A., Torresi, M., Garofolo, G., Criscuolo, A., Brisse, S., Di Pasquale, A., Cammà, C., & Radomski, N. (2022). *In vitro* and *in silico* parameters for precise cgMLST typing of *Listeria monocytogenes*. *BMC Genomics*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08437-4>
- Pan, X., Xu, L., Li, Y., Wu, S., Wu, Y., & Wei, W. (2022). Strategies to Improve the Biosynthesis of β -Lactam Antibiotics by Penicillin G Acylase: Progress and Prospects. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.936487>
- Pancu, D., Scurtu, A., Macasoi, I., Marti, D., Mioc, M., Soica, C., Coricovac, D., Horhat, D., Poenaru, M., & Dehelean, C. (2021). Antibiotics: Conventional therapy and natural compounds with antibacterial activity-a pharmaco-toxicological screening. *Antibiotics*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040401>
- Pärnänen, K., Narciso, C., Kneis, D., Berendonk, T., Cacace, D., Do, T., Elpers, C., Fatta-Kassinos, D., Henriques, I., Jaeger, T., Karkman, A., Martinez, J., Michael, S., Michael, I., O'Sullivan, K., Rodriguez, S., Schwartz, T., Sheng, H., Sørum, H., ... Manaia, C. (2019). Antibiotic resistance in European wastewater treatment plants mirrors the pattern of clinical antibiotic resistance prevalence. *Science Advances*, 5(3). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau9124>
- Paskins, M. (2021). Dyeing off: On the deaths of dyestuffs as scientific objects. *Science in Context*, 34(2). <https://doi.org/10.1017/S0269889722000163>
- Patil, S., & Patel, P. (2021). Bactericidal and Bacteriostatic Antibiotics. In *Infections and Sepsis Development*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.99546>

- Paveenkittiporn, W., Kamjumphol, W., Ungcharoen, R., & Kerdsin, A. (2021). Whole-Genome Sequencing of Clinically Isolated Carbapenem-Resistant *Enterobacterales* Harboring *mcr* Genes in Thailand, 2016–2019. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.586368>
- Perewari, D., Otokunefor, K., & Agbagwa, O. (2022). Tetracycline-Resistant Genes in *Escherichia coli* from Clinical and Nonclinical Sources in Rivers State, Nigeria. *International Journal of Microbiology*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/9192424>
- Pérez, L., González, D., & Vitas, A. (2022). Clonal Complexes 23, 10, 131 and 38 as Genetic Markers of the Environmental Spread of Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL)-Producing *E. coli*. *Antibiotics*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111465>
- Phuadraksa, T., Wichit, S., Arikrit, S., Songtawee, N., & Yainoy, S. (2022). Co-occurrence of *mcr-2* and *mcr-3* genes on chromosome of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from healthy individuals in Thailand. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 60(4). <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2022.106662>
- Pitout, J., & Finn, T. (2020). The evolutionary puzzle of *Escherichia coli* ST131. In *Infection, Genetics and Evolution*, 81. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104265>
- Pitout, J., Peirano, G., Kock, M., Strydom, K., & Matsumura, Y. (2020). The global ascendancy of OXA-48-type carbapenemases. In *Clinical Microbiology Reviews*, 33(1). <https://doi.org/10.1128/CMR.00102-19>
- Pong, C., Harmer, C., Flores, J., Ataide, S., & Hall, R. (2021). Characterization of the specific DNA-binding properties of Tnp26, the transposase of insertion sequence IS26. *Journal of Biological Chemistry*, 297(4). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101165>
- Qian, C., Liu, H., Cao, J., Ji, Y., Lu, W., Lu, J., Li, A., Zhu, X., Shen, K., Xu, H., Chen, Q., Zhou, W., Lu, H., Lin, H., Zhang, X., Li, Q., Lin, X., Li, K., Xu, T., ... Zhang, H. (2021). Identification of *floR* Variants Associated with a Novel Tn4371-Like Integrative and Conjugative Element in Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.685068>

- Quinn, G., Banat, A., Abdelhameed, A., & Banat, I. (2020). Streptomyces from traditional medicine: sources of new innovations in antibiotic discovery. *In Journal of Medical Microbiology*, 69(8). <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001232>
- Ramírez, I., Mejía, F., Medina, J., Cornejo, H., Castillo, M., Querol, J., & Martínez, A. (2023). Prevalence of Plasmid-Associated Tetracycline Resistance Genes in Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Strains Isolated from Environmental, Animal and Human Samples in Panama. *Antibiotics*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020280>
- Ramisetty, B. (2020). Regulation of Type II Toxin-Antitoxin Systems: The Translation-Responsive Model. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00895>
- Reis, A., Kolvenbach, B., Nunes, O., & Corvini, P. (2020). Biodegradation of antibiotics: The new resistance determinants – part II. *In New Biotechnology*, 54. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.08.003>
- Rezatofighi, S., Mirzarazi, M., & Salehi, M. (2021). Virulence genes and phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infection and uninfected control subjects: a case-control study. *BMC Infectious Diseases*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06036-4>
- Rigden, D. (2020). Protein Phosphohistidine Phosphatases of the HP Superfamily. *In Methods in Molecular Biology*, 2077. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9884-5_7
- Rodionova, I., Gao, Y., Monk, J., Hefner, Y., Wong, N., Szubin, R., Lim, H., Rodionov, D. A., Zhang, Z., Saier, M., & Palsson, B. (2022). A systems approach discovers the role and characteristics of seven LysR type transcription factors in *Escherichia coli*. *Scientific reports*, 12(1), 7274. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11134-7>
- Rodriguez, D., Giron, J., Hu, Y., Nataro, J., Ruiz, F., & Santiago, A. (2023). Highly-conserved regulatory activity of the ANR family in the virulence of diarrheagenic bacteria through interaction with master and global regulators. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33997-0>

- Romero, G., Corso, A., Pasterán, F., Shal, J., Sosa, A., Pillonetto, M., Tigulini, R., Hormazábal, J., Araya, P., Saavedra, S., Ovalle, M., Jiménez, M., Chanto, G., Carbon, E., Mazariegos, C., González, S., Satán, C., Villavicencio, F., Touchet, N., ... Melano, R. (2022). Increased Detection of Carbapenemase-Producing *Enterobacterales* Bacteria in Latin America and the Caribbean during the COVID-19 Pandemic. *Emerging Infectious Diseases*, 28(11). <https://doi.org/10.3201/eid2811.220415>
- Ronni, P., Shanthi, G., Al, A., Bindayna, K., & Shahid, M. (2022). Class C type β -lactamases (AmpC β -lactamases). In *Beta-Lactam Resistance in Gram-Negative Bacteria: Threats and Challenges*. https://doi.org/10.1007/978-981-16-9097-6_6
- Ross, J., Larco, D., Colon, O., Coalson, J., Gaus, D., Taylor, K., & Lee, S. (2020). Evolución de la Resistencia a los antibióticos en una zona rural de Ecuador. *Práctica Familiar Rural*, 5(1).
- Roy, N., Alex, S., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A., & Kannabiran, K. (2021). A comprehensive update on antibiotics as an emerging water pollutant and their removal using nano-structured photocatalysts. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(2). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104796>
- Samreen, I., Malak, H., & Abulreesh, H. (2021). Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health. In *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 27. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.08.001>
- Sánchez, M., Cortés, P., Llagostera, M., Barbé, J., & Erill, I. (2020). Exploration into the origins and mobilization of di-hydrofolate reductase genes and the emergence of clinical resistance to trimethoprim. *Microbial Genomics*, 6(11). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000440>
- Sande, C., & Whitfield, C. (2021). Capsules and Extracellular Polysaccharides in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *EcoSal Plus*, 9(2). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0033-2020>
- Sano, E., Esposito, F., Fontana, H., Fuga, B., Cardenas, A., Moura, Q., Cardoso, B., Costa, G., Bosqueiro, T., Sinhorini, J., de Masi, E., Aires, C., & Lincopan, N. (2023). One

- health clones of multidrug-resistant *Escherichia coli* carried by synanthropic animals in Brazil. *One Health*, 16. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2022.100476>
- Schwengers, O., Barth, P., Falgenhauer, L., Hain, T., Chakraborty, T., & Goesmann, A. (2020). Platon: Identification and characterization of bacterial plasmid contigs in short-read draft assemblies exploiting protein sequence-based replicon distribution scores. *Microbial Genomics*, 6(10). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000398>
- Seddek, A., Annamalai, T., & Tse, Y. (2021). Type IA topoisomerases as targets for infectious disease treatments. In *Microorganisms*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010086>
- Senchyna, F., Gaur, R., Sandlund, J., Truong, C., Tremintin, G., Kültz, D., Gomez, C., Tamburini, F., Andermann, T., Bhatt, A., Tickler, I., Watz, N., Budvytiene, I., Shi, G., Tenover, F., & Banaei, N. (2019). Diversity of resistance mechanisms in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* at a health care system in Northern California, from 2013 to 2016. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 93(3). <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.10.004>
- Serwecińska, L. (2020). Antimicrobials and antibiotic-resistant bacteria: A risk to the environment and to public health. *Water (Switzerland)*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/w12123313>
- Sha, Y., Lin, N., Zhang, G., Zhang, Y., Zhao, J., Lu, J., Zhu, T., Zhang, X., Li, Q., Zhang, H., Lin, X., Li, K., Bao, Q., & Li, D. (2023). Identification and characterization of a novel chromosomal aminoglycoside 3'-O-phosphotransferase, *APH(3')-Id*, from *Kluyvera intermedia* DW18 isolated from the sewage of an animal farm. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1224464>
- Shaik, S., Singh, A., Suresh, A., & Ahmed, N. (2022). Genome Informatics and Machine Learning-Based Identification of Antimicrobial Resistance-Encoding Features and Virulence Attributes in *Escherichia coli* Genomes Representing Globally Prevalent Lineages, Including High-Risk Clonal Complexes. *MBio*, 13(1). <https://doi.org/10.1128/MBIO.03796-21>

- Sharif, N., Ahmed, S., Khandaker, S., Monifa, N., Abusharha, A., Vargas, D., Díez, I., Castilla, A., Talukder, A., Parvez, A., & Dey, S. (2023). Multidrug resistance pattern and molecular epidemiology of pathogens among children with diarrhea in Bangladesh, 2019–2021. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41174-6>
- Sheka, D., Alabi, N., & Gordon, P. (2021). Oxford Nanopore Sequencing in clinical microbiology and infection diagnostics. *Briefings in bioinformatics*, 22(5). <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa403>
- Sikand, A., Jaszczur, M., Bloom, L., Woodgate, R., Cox, M., & Goodman, M. (2021). The sos error-prone dna polymerase v mutasome and β -sliding clamp acting in concert on undamaged DNA and during translesion synthesis. *Cells*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/cells10051083>
- Skandalis, N., Maeusli, M., Papafotis, D., Miller, S., Lee, B., Theologidis, I., & Luna, B. (2021). Environmental spread of antibiotic resistance. *Antibiotics*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060640>
- Stsiapanava, A., & Selmer, M. (2019). Crystal structure of *ErmeE* - 23S rRNA methyltransferase in macrolide resistance. *Scientific Reports*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51174-0>
- Sun, K., Liu, Y., Zhou, X., Yin, C., Zhang, P., Yang, Q., Mao, L., Shentu, X., & Yu, X. (2022). Nanopore sequencing technology and its application in plant virus diagnostics. *Frontiers in microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.939666>
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outtersson, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox, E., Houchens, C., Grayson, M., Hansen, P., Singh, N., ... Zorzet, A. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), 318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
- Tamma, P., Aitken, S., Bonomo, R., Mathers, A., Van, D., & Clancy, C. (2021). Infectious Diseases Society of America Guidance on the Treatment of Extended-Spectrum β -

- lactamase Producing *Enterobacterales* (ESBL-E), Carbapenem-Resistant *Enterobacterales* (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with Difficult-to-Treat Resistance (DTR-P. *aeruginosa*). *Clinical Infectious Diseases*, 72(7). <https://doi.org/10.1093/cid/ciab295>
- Tecalco, A., Macías, M., Ramírez, J., Ríos, D., & Zepeda, J. (2021). Mecanismos básicos en la modulación de la expresión génica: algunas implicaciones en el envejecimiento del cerebro. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 24. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2021.0.295>
- Terreni, M., Taccani, M., & Pregnolato, M. (2021). New antibiotics for multidrug-resistant bacterial strains: Latest research developments and future perspectives. *In Molecules*, 26(9). <https://doi.org/10.3390/molecules26092671>
- Thanh, H., Yamamoto, M., Calvopina, M., Bastidas, C., Khong, D., Nguyen, T., Kawahara, R., Yamaguchi, T., & Yamamoto, Y. (2023). Comparative genome analysis of colistin-resistant *Escherichia coli* harboring *mcr* isolated from rural community residents in Ecuador and Vietnam. *PloS one*, 18(11), e0293940. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0293940>
- Tyryshkina, A., Coraor, N., & Nekrutenko, A. (2019). Predicting runtimes of bioinformatics tools based on historical data: Five years of Galaxy usage. *Bioinformatics*, 35(18). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz054>
- Uddin, T., Chakraborty, A., Khusro, A., Zidan, B., Mitra, S., Emran, T. Bin, Dhama, K., Ripon, M., Gajdács, M., Sahibzada, M., Hossain, M., & Koirala, N. (2021). Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *In Journal of Infection and Public Health*, 14(12). <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>
- Uluseker, C., Kaster, K., Thorsen, K., Basiry, D., Shobana, S., Jain, M., Kumar, G., Kommedal, R., & Pala, I. (2021). A Review on Occurrence and Spread of Antibiotic Resistance in Wastewaters and in Wastewater Treatment Plants: Mechanisms and Perspectives. *In Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.717809>

- Undurraga, E., Peters, A., Arias, C., & Munita, J. (2023). Lives lost and disease burden related to antimicrobial resistance in the Americas can no longer be ignored. *In Lancet Regional Health – Americas*, 26. <https://doi.org/10.1016/j.lana.2023.100596>
- Vale, A., Shubin, L., Cummins, J., Leonard, F., & Barry, G. (2021). Detection of *bla*_{OXA-1}, *bla*_{TEM-1}, and Virulence Factors in *E. coli* Isolated from Seals. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.583759>
- Valenzuela, X., Hedman, H., Villagomez, A., Cardenas, P., Eisenberg, J., Levy, K., Zhang, L., & Trueba, G. (2023). Distribution of *bla*_{CTX-M}-gene variants in *E. coli* from different origins in Ecuador. *Medicine in Microecology*, 18(February), 100092. <https://doi.org/10.1016/j.medmic.2023.100092>
- Van der Zwaluw, K., Witteveen, S., Wielders, L., van Santen, M., Landman, F., de Haan, A., Schouls, L., Bosch, T., Cohen, J., Melles, D., van Dijk, K., Visser, C., Notermans, D. W., van Ogtrop, M., Werdmuller, B., van Hees, B., Kluytmans, J., van den Bijllaardt, W., Kraan, E., ... Wolfhagen, M. (2020). Molecular characteristics of carbapenemase-producing *Enterobacterales* in the Netherlands; results of the 2014–2018 national laboratory surveillance. *Clinical Microbiology and Infection*, 26(10). <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.01.027>
- Van Groesen E., Innocenti, P., & Martin, N. (2022). Recent Advances in the Development of Semisynthetic Glycopeptide Antibiotics: 2014-2022. *In ACS Infectious Diseases*, 8(8). <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00253>
- Vanmeter, K., & Hubert, R. (2023). Microbiología En Ciencias de la Salud. *Elsevier Health Sciences*.
- Vasiljevic, N., Lim, M., Humble, E., Seah, A., Kratzer, A., Morf, N., Prost, S., & Ogden, R. (2021). Developmental validation of Oxford Nanopore Technology MinION sequence data and the NGSpeciesID bioinformatic pipeline for forensic genetic species identification. *Forensic Science International: Genetics*, 53, 102493. <https://doi.org/10.1016/J.FSIGEN.2021.102493>
- Verschuuren, T., Bosch, T., Mascaro, V., Willems, R., & Kluytmans, J. (2022). External validation of WGS-based antimicrobial susceptibility prediction tools, KOVER-AMR

- and ResFinder 4.1, for *Escherichia coli* clinical isolates. *Clinical Microbiology and Infection*, 28(11). <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2022.05.024>
- Wakinaka, T., & Watanabe, J. (2019). Transposition of IS4 Family Insertion Sequences ISTeha3, ISTeha4, and ISTeha5 into the arc Operon Disrupts Arginine Deiminase System in *Tetragenococcus halophilus*. *Applied and environmental microbiology*, 85(10), e00208-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.00208-19>
- Wang, C., Cancino, A., Baste, J., Marten, D., Joshi, A. A., Nasreen, A., & Bhushan, A. (2022). Causative Role of Anoxic Environment in Bacterial Regulation of Human Intestinal Function. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 15(5). <https://doi.org/10.1007/s12195-022-00735-x>
- Wang, J., Huang, Y., Guan, C., Li, J., Yang, H., Zhao, G., Liu, C., Ma, J., & Tang, B. (2023). Characterization of an *Escherichia coli* Isolate Coharboring the Virulence Gene *astA* and Tigecycline Resistance Gene *tet(X4)* from a Dead Piglet. *Pathogens*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/pathogens12070903>
- Wang, Q., Mao, C., Lei, L., Yan, B., Yuan, J., Guo, Y., Li, T., Xiong, X., Cao, X., Huang, J., Han, J., Yu, K., & Zhou, B. (2022). Antibiotic resistance genes and their links with bacteria and environmental factors in three predominant freshwater aquaculture modes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 241. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113832>
- Wang, X., Chen, X., Luo, S., Ma, W., Li, N., Zhang, W., Tikunov, Y., Xuan, S., Zhao, J., Wang, Y., Zheng, G., Yu, P., Bai, Y., Bovy, A., & Shen, S. (2022). Discovery of a DFR gene that controls anthocyanin accumulation in the spiny *Solanum* group: roles of a natural promoter variant and alternative splicing. *Plant Journal*, 111(4). <https://doi.org/10.1111/tpj.15877>
- Wang, Y., Zhao, Y., & Bollas, A. (2021). Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01108-x>
- Waters, W., Baca, M., Graham, J., Butzin, Z., & Vinuela, L. (2022). Antibiotic use by backyard food animal producers in Ecuador: a qualitative study. *BMC Public Health*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12889-022-13073-4>

- Wick, R., Judd, L., & Holt, K. (2023). Assembling the perfect bacterial genome using Oxford Nanopore and Illumina sequencing. *PLoS Computational Biology*, 19(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010905>
- Wilson, B., Eisenstein, M., & Soh, H. (2019). High-Fidelity Nanopore Sequencing of Ultra-Short DNA Targets. *Analytical Chemistry*, 91(10), 6783–6789. https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.9B00856/ASSET/IMAGES/LARGE/AC-2019-00856U_0005.JPEG
- World Health Organization World Health Organization. (2019a). *Critically Important Antimicrobials for Human Medicine*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241515528>
- World Health Organization. (2019b). The 2019 WHO AWaRe classification of antibiotics for evaluation and monitoring of use. <https://www.who.int/publications/i/item/WHOEMPIAU2019.11>
- World Health Organization. (2019c). *No time to wait: Securing the future from drug-resistant infections*. <https://www.who.int/publications/i/item/no-time-to-wait-securing-the-future-from-drug-resistant-infections>
- World Health Organization. (2020). *GLASS Whole-genome sequencing for surveillance of antimicrobial resistance* <https://www.who.int/publications/i/item/9789240011007>
- Xiang, Y., Wu, F., Chai, Y., Xu, X., Yang, L., Tian, S., Zhang, H., Li, Y., Yang, C., Liu, H., Qiu, S., Song, H., & Sun, Y. (2020). A new plasmid carrying *mphA* causes prevalence of azithromycin resistance in enterotoxigenic *Escherichia coli* serogroup O6. *BMC Microbiology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01927-z>
- Xiao, X., Liu, Z., Chen, X., Peng, K., Li, R., Liu, Y., & Wang, Z. (2022). Persistence of plasmid and *tet(X4)* in an *Escherichia coli* isolate coharboring *bla_{NDM-5}* and *mcr-1* after acquiring an IncFII *tet(X4)*-positive plasmid. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.101038>
- Yamamoto, S., Kitagawa, W., Nakano, M., Asakura, H., Iwabuchi, E., Sone, T., & Asano, K. (2020). Plasmid Sequences of Four Large Plasmids Carrying Antimicrobial Resistance

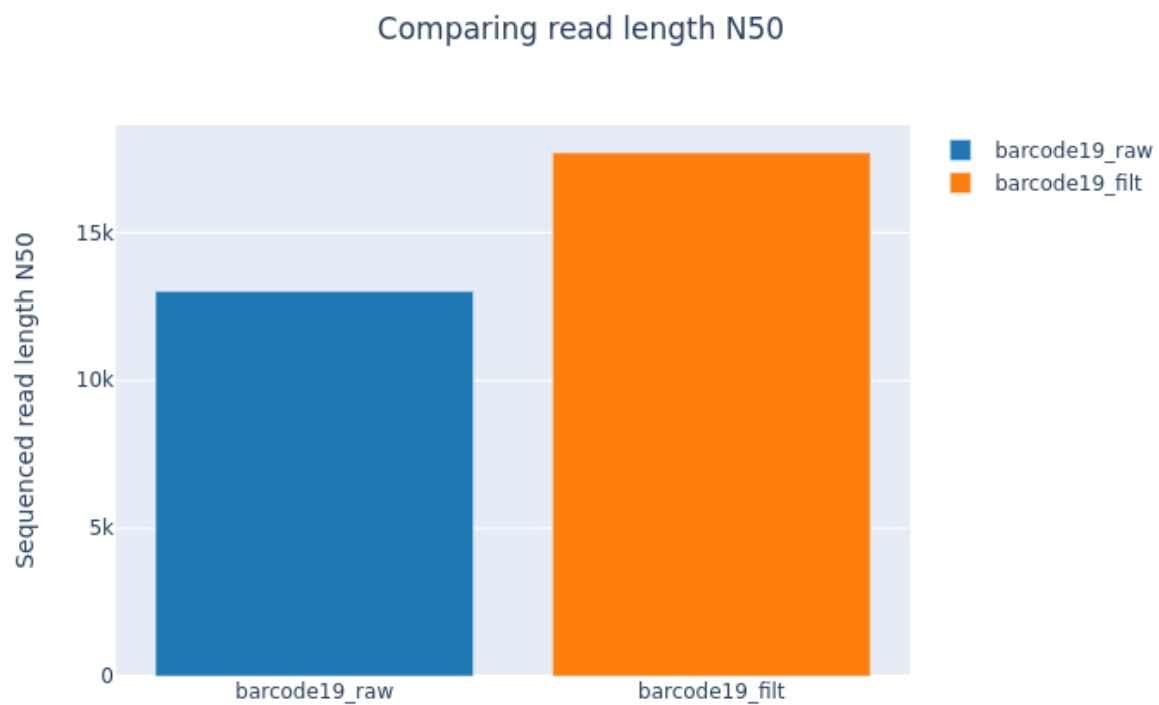
- Genes in *Escherichia coli* Strains Isolated from Beef Cattle in Japan. *Microbiology Resource Announcements*, 9(20). <https://doi.org/10.1128/mra.00219-20>
- Yang, F., Zhang, F., Li, H., Wu, H., Zhao, H., Cheng, X., Ba, Y., Huang, H., Chen, S., & Zhu, J. (2021). Contribution of environmental factors on the distribution of antibiotic resistance genes in agricultural soil. *European Journal of Soil Biology*, 102. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2020.103269>
- Yang, Y., Li, H., Wei, Y., Chen, Z., Chen, T., Liang, Y., Yin, J., Yang, D., Yang, Z., Shi, D., Zhou, S., Wang, H., Li, J., & Jin, M. (2022). Comprehensive insights into profiles and bacterial sources of intracellular and extracellular antibiotic resistance genes in groundwater. *Environmental Pollution*, 307. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119541>
- Yang, Y., Yang, Y., Ahmed, M., Qin, M., He, R., Wu, Y., Liang, X., Zhong, L., Chen, P., Deng, B., Hassan, R., Wen, W., Xu, L., Huang, X., Xu, L., & Tian, G. (2022). Carriage of distinct *bla*_{KPC-2} and *bla*_{OXA-48} plasmids in a single ST11 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolate in Egypt. *BMC Genomics*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-021-08214-9>
- Yao, Y., Imirzalioglu, C., Falgenhauer, L., & Chakraborty, T. (2022). New Delhi Metallo- β -Lactamase-Producing *Enterobacterales* Bacteria. In *Emerging Infectious Diseases*, 28(1). <https://doi.org/10.3201/eid2801.212106>
- Yin, R., Kwoh, C., & Zheng, J. (2019). Whole Genome Sequencing Analysis. Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: *ABC of Bioinformatics*, 1–3, 176–183. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20095-2>
- Ying, Y., Wu, F., Wu, C., Jiang, Y., Yin, M., Zhou, W., Zhu, X., Cheng, C., Zhu, L., Li, K., Lu, J., Xu, T., & Bao, Q. (2019). Florfenicol Resistance in *Enterobacteriaceae* and Whole-Genome Sequence Analysis of Florfenicol-Resistant *Leclercia adecarboxylata* Strain R25. *International Journal of Genomics*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9828504>

- Yoon, S., & Lee, Y. (2022). Molecular characteristics of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis. *Journal of Veterinary Science*, 23(3). <https://doi.org/10.4142/JVS.21105>
- Yu, D., Horton, J., Yang, J., Hajian, T., Vedadi, M., Sagum, C., Bedford, M., Blumenthal, R. M., Zhang, X., & Cheng, X. (2021). Human MettL3-MettL14 RNA adenine methyltransferase complex is active on double-stranded DNA containing lesions. *Nucleic acids research*, 49(20), 11629–11642. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab460>
- Zahra, Q., Gul, J., Raza, A., Yasir, M., & Mustafa, A. (2023). Antibiotic resistance genes prevalence prediction and interpretation in beaches affected by urban wastewater discharge. *One Health*, 17, 100642. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2023.100642>
- Zhang, F., & Cheng, W. (2022). The Mechanism of Bacterial Resistance and Potential Bacteriostatic Strategies. *In Antibiotics*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091215>
- Zhou, W., Lin, R., Zhou, Z., Ma, J., Lin, H., Zheng, X., Wang, J., Wu, J., Dong, Y., Jiang, H., Yang, H., Yang, Z., Tang, B., & Yue, M. (2022). Antimicrobial resistance and genomic characterization of *Escherichia coli* from pigs and chickens in Zhejiang, China. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1018682>
- Zhou, X. (2023). Antibiotic Culture: A History of Antibiotic Use in the Second Half of the 20th and Early 21st Century in the People's Republic of China. *Antibiotics*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030510>
- Zhu, X., Li, P., Qian, C., Liu, H., Lin, H., Zhang, X., Li, Q., Lu, J., Lin, X., Xu, T., Zhang, H., Hu, Y., Bao, Q., & Li, K. (2020). Prevalence of aminoglycoside resistance genes and molecular characterization of a novel gene, *aac(3)-IIg*, among clinical isolates of the *Enterobacter cloacae* complex from a chinese teaching hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(9). <https://doi.org/10.1128/AAC.00852-20>
- Zong, Z., Fenn, S., Connor, C., Feng, Y., & McNally, A. (2018). Complete genomic characterization of two *Escherichia coli* lineages responsible for a cluster of carbapenem-resistant infections in a Chinese hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(9). <https://doi.org/10.1093/jac/dky210>

Anexos

Anexo 1

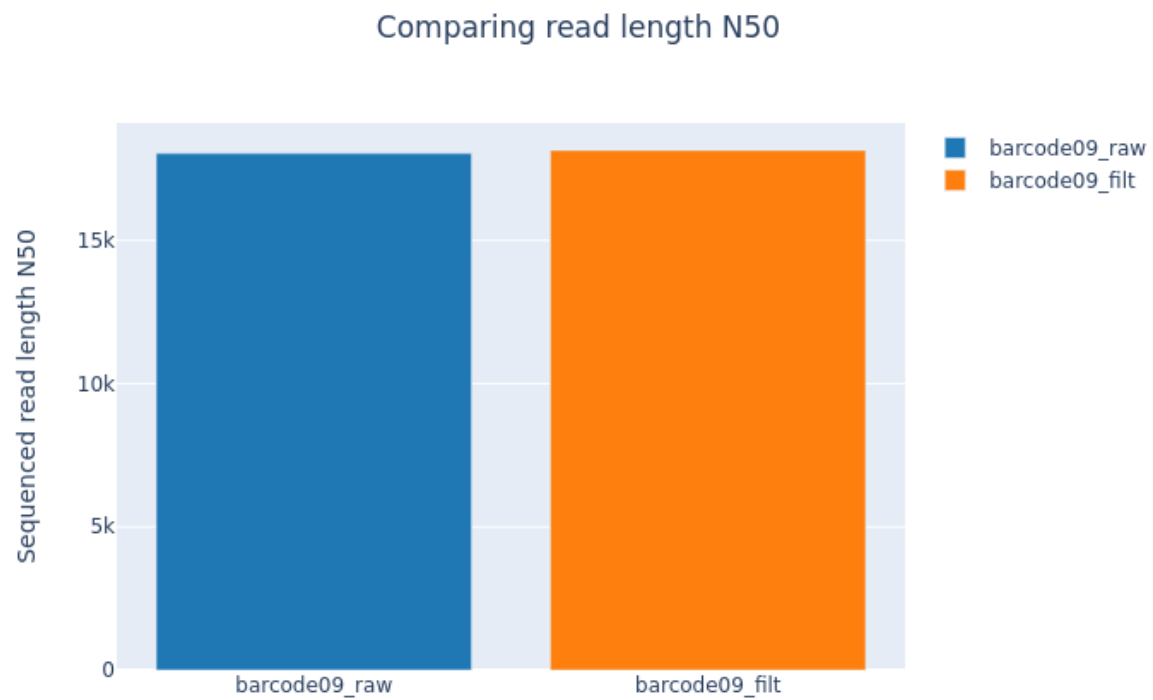
Comparación del número de lecturas N50 de la cepa E. coli 62A (barcode 19)



Nota. Comparación entre los documentos barcode19_raw (13.013k) y barcode19_filt (17.704k) mediante NanoComp. El filtlong fue de 5000pb.

Anexo 2

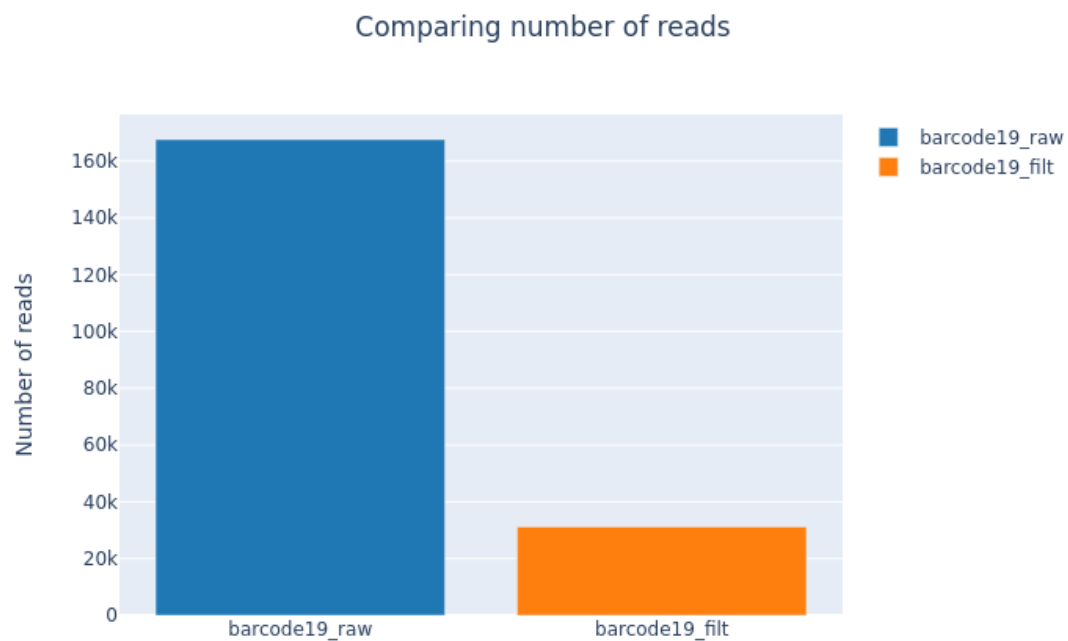
Comparación del número de lecturas N50 de la cepa E. coli 17A (barcode 09)



Nota. Comparación entre los documentos barcode09_raw (18.035k) y barcode09_filt (18.145k) mediante NanoComp. El filtlong fue de 500pb.

Anexo 3

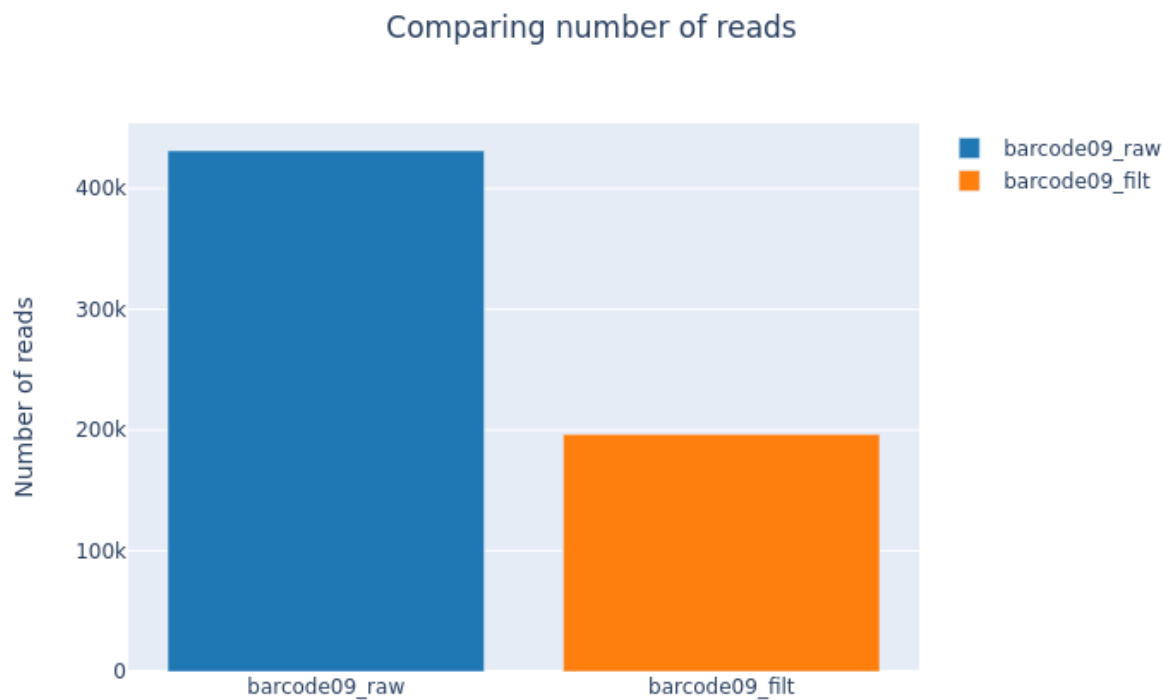
Comparación del número de lecturas de la cepa E. coli 62A (barcode 19)



Nota. Comparación entre los documentos barcode19_raw (167.585k) y barcode19_filt (31.176k) mediante NanoComp. El filtlong fue de 5000pb.

Anexo 4

Comparación del número de lecturas de la cepa E. coli 17A (barcode 09)



Nota. Comparación entre los documentos barcode09_raw (431.349k) y barcode09_filt (196.452k) mediante NanoComp. El filtlong fue de 500pb.

Anexo 5

MLST de Atchman de la cepa de E. coli 17A

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
adk	100	100	536	536	0	adk_8
fumC	100	100	469	469	0	fumC_7
gyrB	100	100	460	460	0	gyrB_1
icd	100	100	518	518	0	icd_8
mdh	100	100	452	452	0	mdh_8
purA	100	100	478	478	0	purA_13
recA	100	100	510	510	0	recA_47

Nota. “*Escherichia coli*#1”. Tipo de secuencia (ST): 1598.

Anexo 6

MLST de Pasteur de la cepa de E. coli 17A

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
dinB	100	100	450	450	0	dinB_10
icdA	100	100	516	516	0	icdA_2
pabB	100	100	468	468	0	pabB_3
polB	100	100	450	450	0	polB_17

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
putP	100	100	456	456	0	putP_18
trpA	100	100	561	561	0	trpA_1
trpB	100	100	594	594	0	trpB_4
uidA	100	100	600	600	0	uidA_22

Nota. “Escherichia coli#2”. Tipo de secuencia (ST): 398.

Anexo 7

MLST de Atchman de la cepa de E. coli 62A

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
adk	100	100	536	536	0	adk_10
fumC	100	100	469	469	0	fumC_11
gyrB	100	100	460	460	0	gyrB_4
icd	100	100	518	518	0	icd_8
mdh	100	100	452	452	0	mdh_8
purA	100	100	478	478	0	purA_8
recA	100	100	510	510	0	recA_2

Nota. “Escherichia coli#1”. Tipo de secuencia (ST): 10

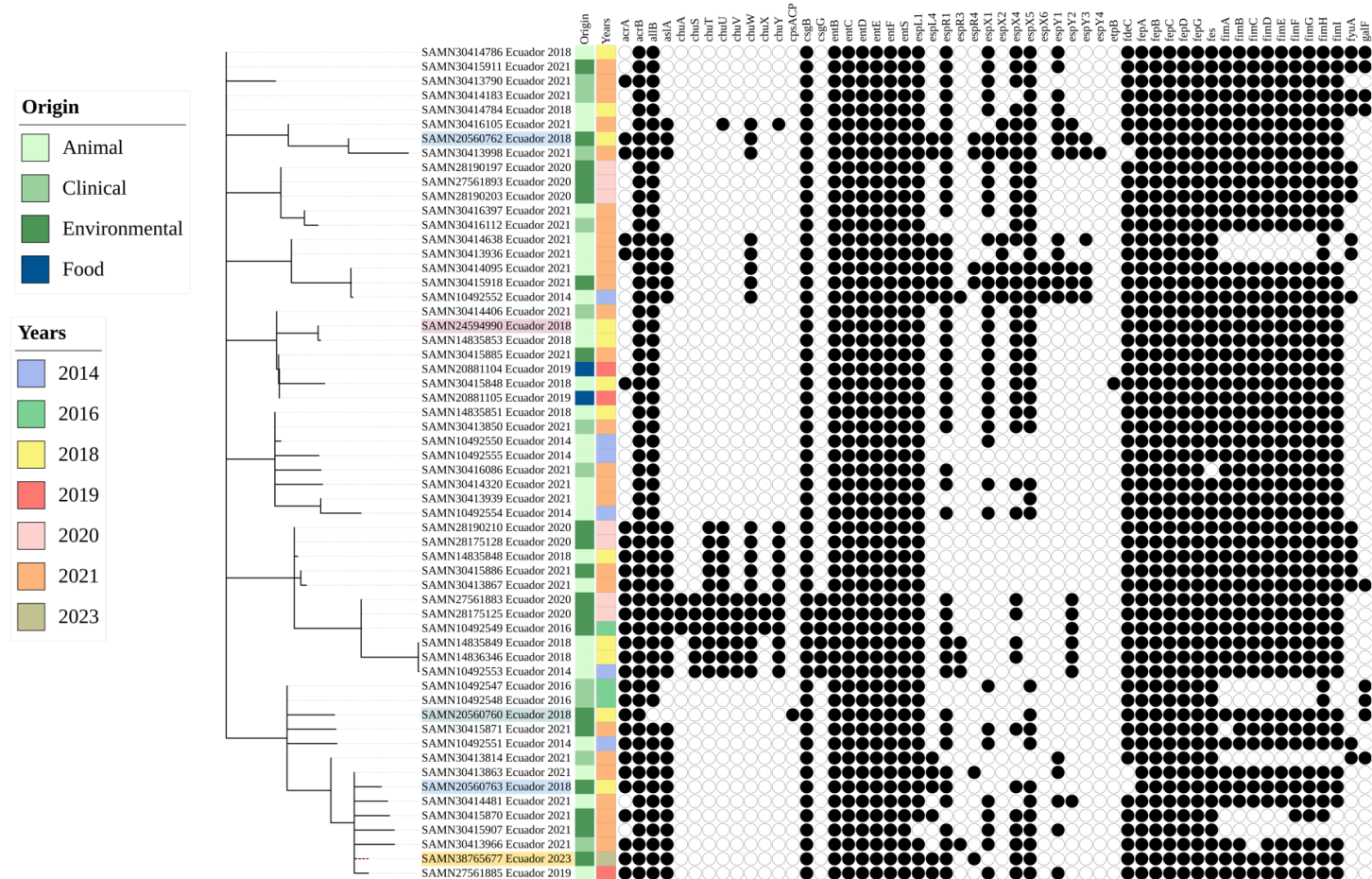
Anexo 8

MLST de Pasteur de la cepa de E. coli 62A

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
dinB	100	100	450	450	0	dinB_8
icdA	100	100	516	516	0	icdA_2
pabB	100	100	468	468	0	pabB_7
polB	100	100	450	450	0	polB_235
putP	100	100	456	456	0	putP_7
trpA	100	100	561	561	0	trpA_1
trpB	100	100	594	594	0	trpB_4
uidA	100	100	600	600	0	uidA_2

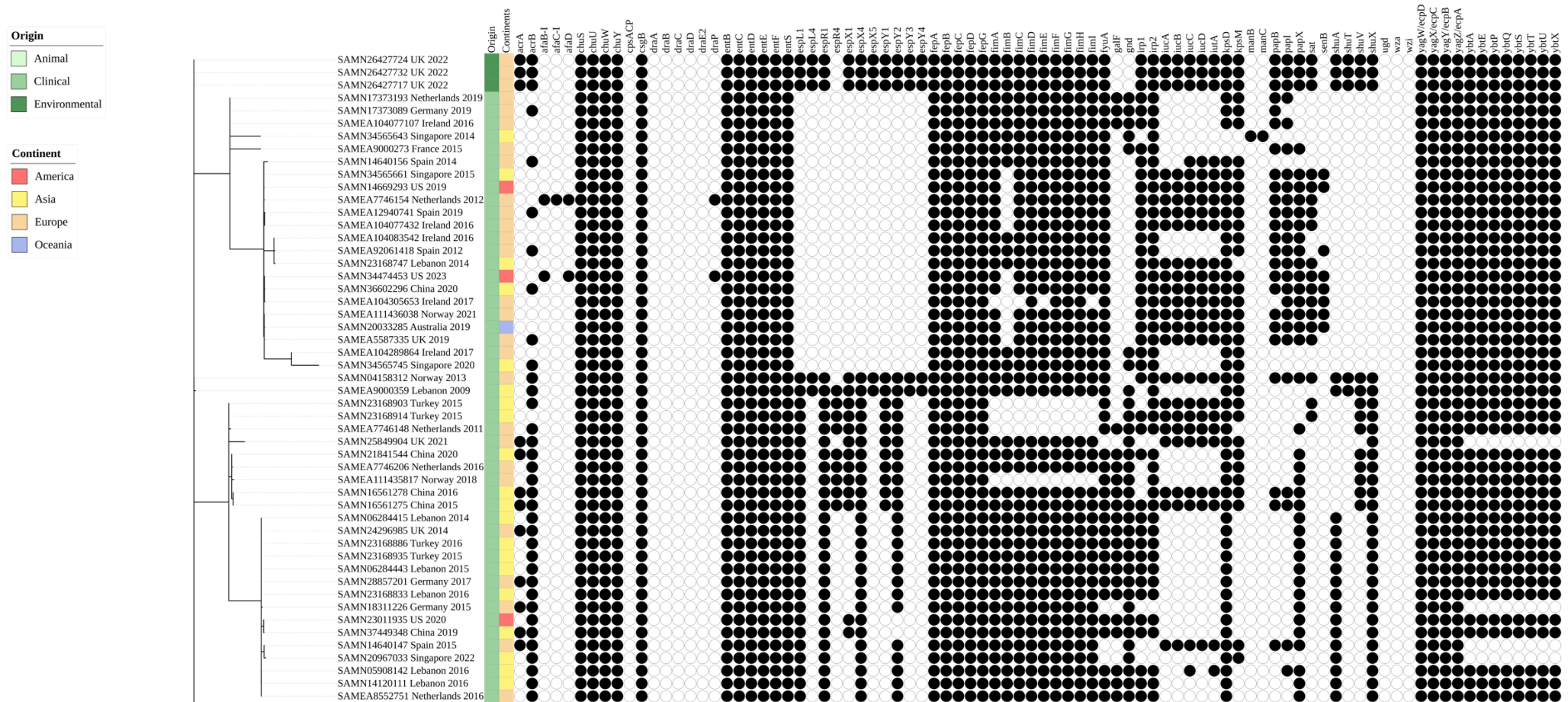
Nota. “Escherichia coli#2”. Tipo de secuencia cercanos (ST): 478, 877, 1180, 2, 760, 365, 835.

Árbol filogenético rectangular con genes de virulencia para 57 aislamientos de E. coli de diverso origen en comparación con la WGS de la cepa 62A. Parte I



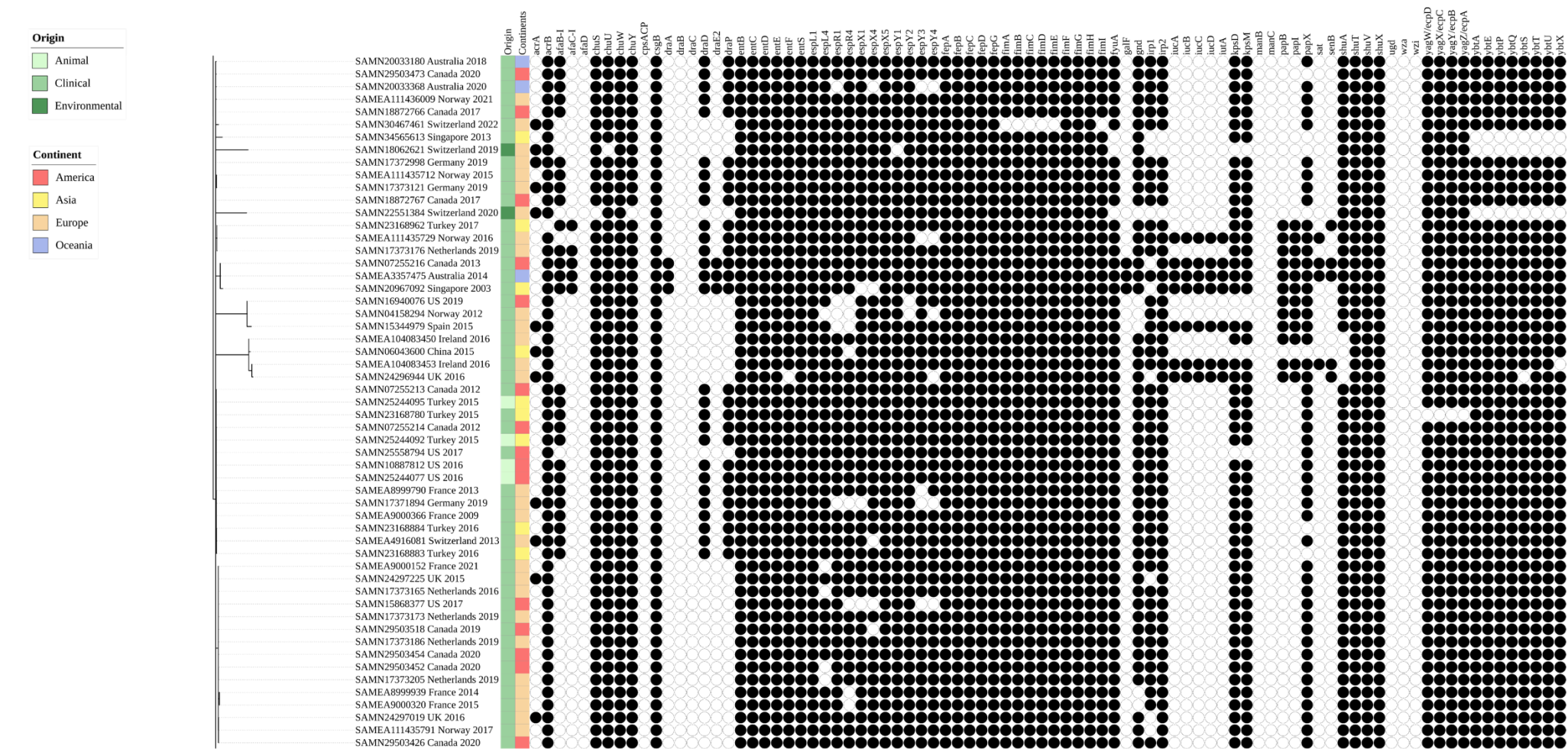
Nota. En la parte superior de cada columna se encuentra el nombre de los genes de virulencia. Si existe la presencia de gen de virulencia en cada secuencia, el círculo está lleno. Los nombres de los aislamientos marcados de color azul, morado y amarillo pertenecen al banco de cepas UTARAM-ONE HEALTH. El aislamiento de color amarillo es el que contiene el gen de interés, *mcr-1*.

Árbol filogenético rectangular con genes de virulencia para 149 aislamientos de E. coli de diverso origen en comparación con la WGS de la cepa 17A. Parte I



Nota. En la parte superior de cada columna se encuentra el nombre de los genes de virulencia. Si existe la presencia de gen de virulencia en cada secuencia, el círculo está lleno.

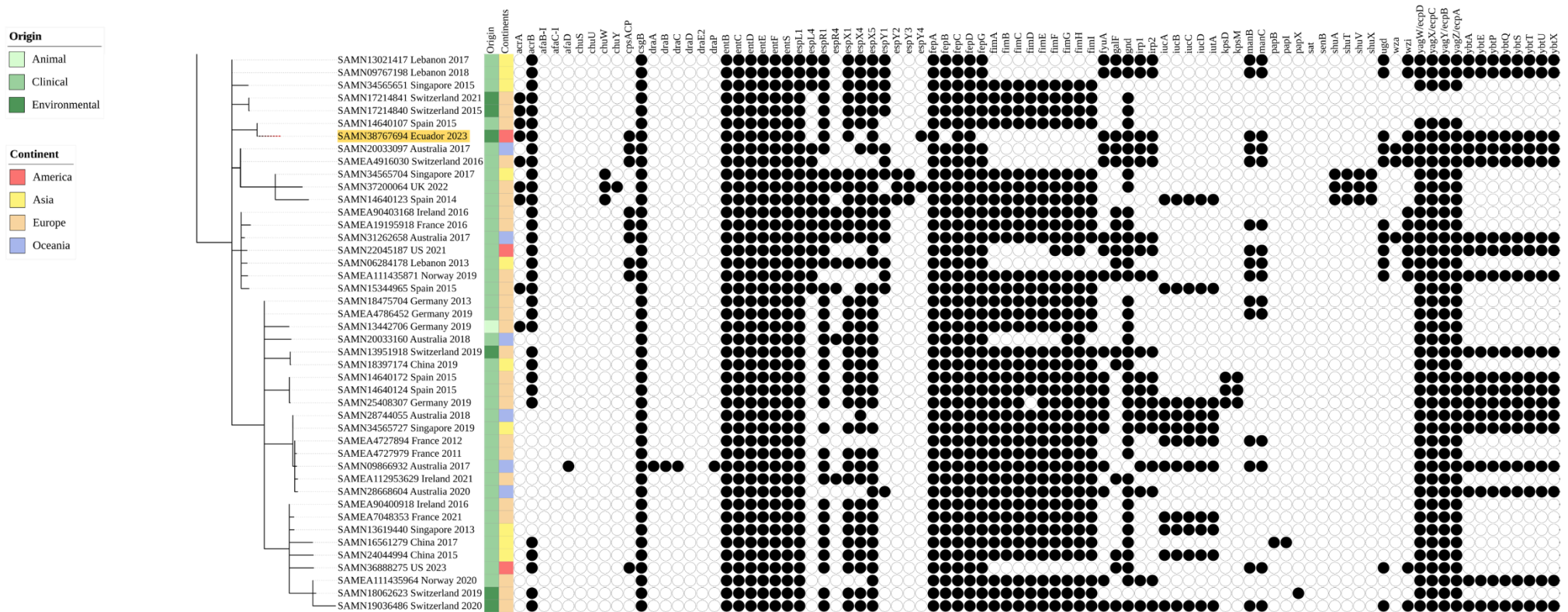
Árbol filogenético rectangular con genes de virulencia para 149 aislamientos de *E. coli* de diverso origen en comparación con la WGS de la cepa 17A. Parte II



Nota. En la parte superior de cada columna se encuentra el nombre de los genes de virulencia. Si existe la presencia de gen de virulencia en cada secuencia, el círculo está lleno.

Árbol filogenético rectangular con genes de virulencia para 149 aislamientos de E. coli de diverso origen en comparación con la WGS de la cepa 17A. Parte III

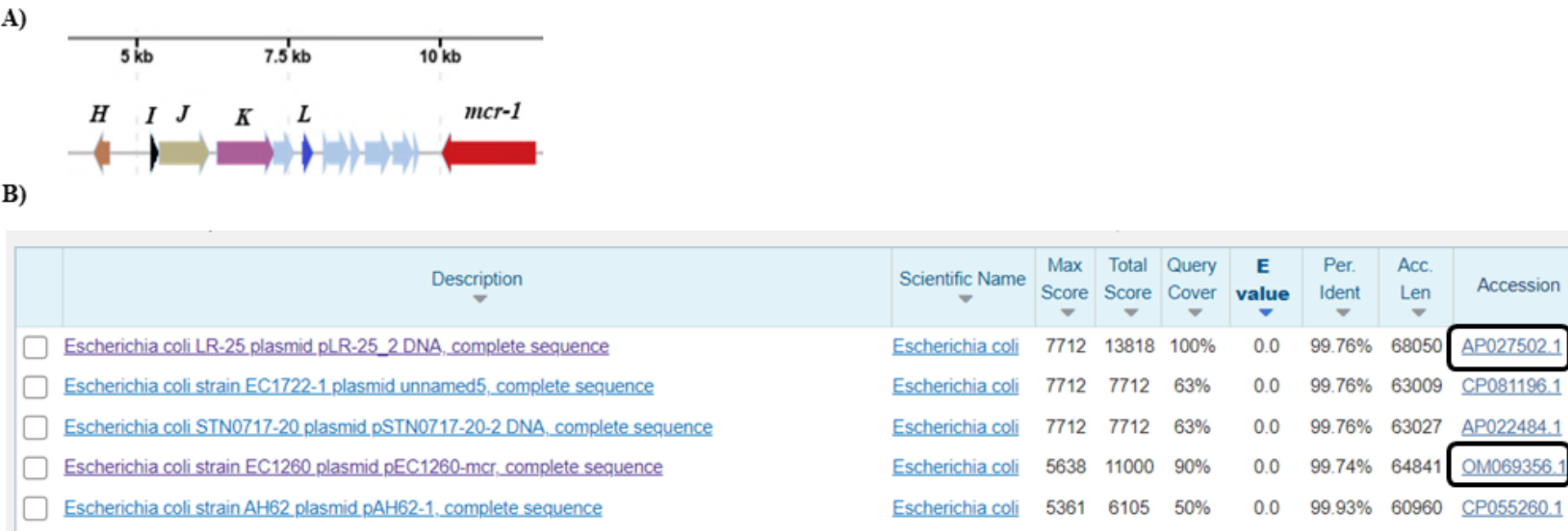
Árbol filogenético rectangular con genes de virulencia para 149 aislamientos de E. coli de diverso origen en comparación con la WGS de la cepa 17A. Parte III



Nota. En la parte superior de cada columna se encuentra el nombre de los genes de virulencia. Si existe la presencia de gen de virulencia en cada secuencia, el círculo está lleno. El asilamiento de color amarillo es el que contiene el gen de interés, *bla*_{OXA-48}.

Anexo 14

BLAST de una región de la cepa *E. coli* 62A



Nota. BLAST de la región que se encuentre en la **Figura A)**, secuencias homólogas obtenidas como resultado del BLAST, asilado de Vietman con 100% de homología (GenBank: AP027502.1) y de Bangladesh con un 90% (GenBank: OM069356.1).

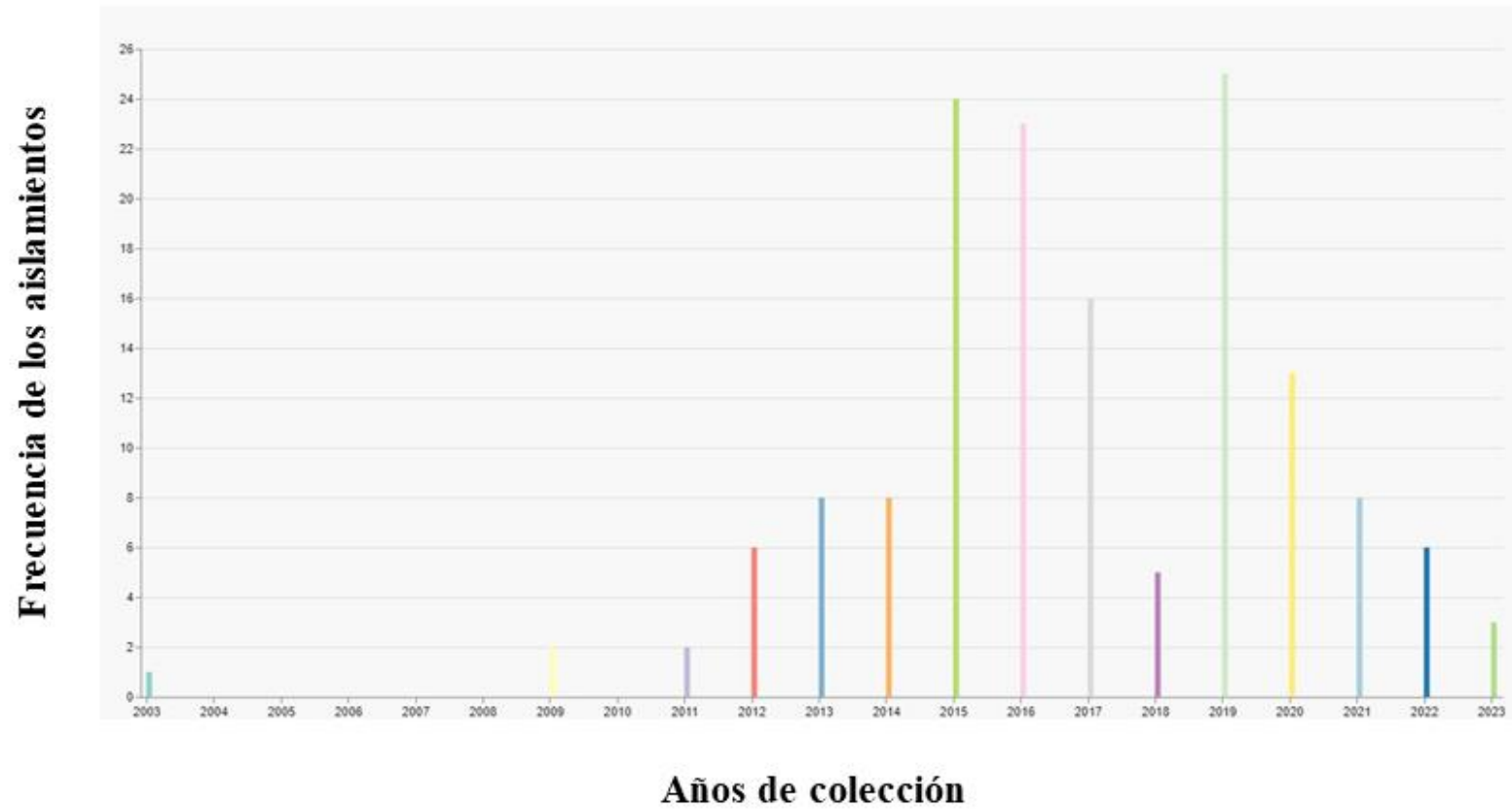
Anexo 15

Mapa Geográfico con los 150 aislamientos del gen bla_{OXA-48}



Anexo 16

Gráfica con los 150 aislamientos vs los años de colección del gen bla_{OXA-48}



Anexo 17

Aislamientos de E. coli con el gen mcr-1 de diferente origen y años de colección en Ecuador

Isolation type	BioSample	Año	MLST Achtman	MLST Pasteur
Animal	SAMN10492550	2014	156	19
	SAMN10492551	2014	665	-
	SAMN10492552	2014	2847	1064
	SAMN10492553	2014	354	39
	SAMN10492554	2014	602	-
	SAMN10492555	2014	191	-
	SAMN14835848	2018	117	-
	SAMN14835849	2018	354	39
	SAMN14835851	2018	156	19
	SAMN14835853	2018	1196	-
	SAMN14836346	2018	354	-
	SAMN24594990	2018	1196	632
	SAMN27561885	2019	10	-
	SAMN30413863	2021	-	2
	SAMN30413867	2021	117	-
	SAMN30413936	2021	57	533
	SAMN30413939	2021	359	88
	SAMN30414095	2021	2847	1064
	SAMN30414320	2021	162	355
	SAMN30414481	2021	5542	-
	SAMN30414638	2021	57	-
	SAMN30414784	2018	58	-
	SAMN30414786	2018	58	-
	SAMN30415848	2018	4663	-
	SAMN30416105	2021	1011	31
	SAMN30416397	2021	23	708
Clinical	SAMN10492547	2016	609	-
	SAMN10492548	2016	609	-
	SAMN30413790	2021	111	-
	SAMN30413814	2021	167	877
	SAMN30413850	2021	156	19

Isolation type	BioSample	Año	MLST Achtman	MLST Pasteur
Environmental	SAMN30413966	2021	100	-
	SAMN30413998	2021	1140	-
	SAMN30414183	2021	58	-
	SAMN30414406	2021	224	730
	SAMN30416086	2021	7285	-
	SAMN30416112	2021	410	471
	SAMN38765677	2023	10	8
	SAMN10492549	2016	457	594
	SAMN20560760	2018	10779	-
	SAMN20560762	2018	5876	1063
	SAMN20560763	2018	10	-
	SAMN27561883	2020	457	594
	SAMN27561893	2020	88	961
	SAMN28175125	2020	457	-
	SAMN28175128	2020	117	-
	SAMN28190197	2020	88	961
	SAMN28190203	2020	88	961
	SAMN28190210	2020	117	-
	SAMN30415870	2021	1585	-
	SAMN30415871	2021	1684	-
	SAMN30415885	2021	224	730
	SAMN30415886	2021	117	48
	SAMN30415907	2021	206	999
	SAMN30415911	2021	58	-
	SAMN30415918	2021	2847	1064
Food	SAMN20881104	2019	224	730
	SAMN20881105	2019	-	730

Nota. Los aislamientos presentados en la tabla corresponden únicamente a origen ecuatoriano y los mismos fueron obtenidos de la plataforma de NCBI. El aislado marcado de color amarillo pertenece al aislamiento de la cepa *E. coli* 62A con el gen *mcr-1*.

Anexo 18

Aislamientos de E. coli con el gen bla_{OXA-48} de diferente origen y ubicación geográfica a nivel mundial

Continent	BioSample	Location	Isolation type	Year	MLST Achtman	MLST Pasteur
America	SAMN10887812	USA	animal	2016	131	-
	SAMN25244077	USA	animal	2016	227	8
	SAMN07255216	Canada	clinical	2013	10	-
	SAMN22045187	USA	clinical	2021	10	506
	SAMN16940076	USA	clinical	2019	38	-
	SAMN29503426	Canada	clinical	2020	38	3
	SAMN29503452	Canada	clinical	2020	38	39
	SAMN29503454	Canada	clinical	2020	38	-
	SAMN29503518	Canada	clinical	2019	38	-
	SAMN36888275	USA	clinical	2023	38	8
	SAMN34474453	USA	clinical	2023	69	8
	SAMN23011935	USA	clinical	2020	131	1019
	SAMN07255213	Canada	clinical	2012	295	86
	SAMN14669293	USA	clinical	2019	354	2
	SAMN15868377	USA	clinical	2017	354	567
	SAMN18872767	Canada	clinical	2017	410	-
	SAMN07255214	Canada	clinical	2012	448	39
	SAMN18872766	Canada	clinical	2017	538	88
	SAMN25558794	USA	clinical	2017	1485	39
	SAMN29503473	Canada	clinical	2020	1485	8
	SAMN38767694	Ecuador	environmental	2023	10	8
Asia	SAMN25244092	Turkey	animal	2015	38	8
	SAMN25244095	Turkey	animal	2015	38	8
	SAMN06043600	China	clinical	2015	38	32
	SAMN06284415	Lebanon	clinical	2014	38	39
	SAMN06284443	Lebanon	clinical	2015	38	58
	SAMN16561275	China	clinical	2015	38	39
	SAMN16561278	China	clinical	2016	38	-
	SAMN18397174	China	clinical	2019	38	44
	SAMN34565661	Singapore	clinical	2015	38	8
	SAMN34565704	Singapore	clinical	2017	38	44
	SAMN37449348	China	clinical	2019	38	866
	SAMN23168935	Turkey	clinical	2015	58	537
	SAMN13619440	Singapore	clinical	2013	69	-
	SAMN09767198	Lebanon	clinical	2018	101	-
	SAMN20967092	Singapore	clinical	2003	101	-
	SAMN06284178	Lebanon	clinical	2013	127	-
	SAMN16561279	China	clinical	2017	127	43
	SAMN14120111	Lebanon	clinical	2016	131	-
	SAMN23168884	Turkey	clinical	2016	131	-
	SAMN23168886	Turkey	clinical	2016	131	-
	SAMN34565613	Singapore	clinical	2013	131	-
	SAMN34565651	Singapore	clinical	2015	131	43
	SAMN23168833	Lebanon	clinical	2016	137	86

Continent	BioSample	Location	Isolation type	Year	MLST Achtman	MLST Pasteur
Asia	SAMN23168962	Turkey	clinical	2017	297	-
	SAMN05908142	Lebanon	clinical	2016	354	8
	SAMN20967033	Singapore	clinical	2022	354	471
	SAMN23168747	Lebanon	clinical	2014	354	39
	SAMN34565727	Singapore	clinical	2019	354	-
	SAMEA9000359	Lebanon	clinical	2009	359	8
	SAMN21841544	China	clinical	2020	405	43
	SAMN36602296	China	clinical	2020	405	8
	SAMN23168780	Turkey	clinical	2015	453	527
	SAMN34565745	Singapore	clinical	2020	656	-
	SAMN34565643	Singapore	clinical	2014	940	8
	SAMN13021417	Lebanon	clinical	2017	1236	-
	SAMN23168914	Turkey	clinical	2015	1406	8
	SAMN24044994	China	clinical	2015	2538	-
	SAMN23168883	Turkey	clinical	2016	2600	346
	SAMN23168903	Turkey	clinical	2015	11260	-
Europe	SAMN13442706	Germany	animal	2019	131	712
	SAMN14640156	Spain	clinical	2014	10	39
	SAMN14640172	Spain	clinical	2015	10	39
	SAMEA8999939	France	clinical	2014	12	471
	SAMEA104083450	Ireland	clinical	2016	38	974
	SAMEA104083542	Ireland	clinical	2017	38	43
	SAMEA111435729	Norway	clinical	2016	38	2
	SAMEA111435791	Norway	clinical	2017	38	8
	SAMEA111435817	Norway	clinical	2018	38	8
	SAMEA111435871	Norway	clinical	2019	38	8
	SAMEA111435964	Norway	clinical	2020	38	8
	SAMEA111436009	Norway	Clinical	2021	38	8
	SAMEA111436038	Norway	Clinical	2021	38	8
	SAMEA112953629	Ireland	Clinical	2021	38	8
	SAMEA12940741	Spain	Clinical	2019	38	8
	SAMEA19195918	France	Clinical	2016	38	8
	SAMEA8552751	Netherlands	Clinical	2016	38	2
	SAMEA8999790	France	Clinical	2013	38	471
	SAMEA9000152	France	Clinical	2021	38	88
	SAMEA9000273	France	Clinical	2015	38	-
	SAMEA9000320	France	Clinical	2015	38	8
	SAMN17371894	Germany	Clinical	2019	38	8
	SAMN17373173	Netherlands	Clinical	2019	38	8
	SAMN17373193	Netherlands	Clinical	2019	38	-
	SAMN18311226	Germany	Clinical	2015	38	43
	SAMN18475704	Germany	Clinical	2013	38	8
	SAMN24297225	United Kingdom	Clinical	2015	38	-
	SAMN25408307	Germany	Clinical	2019	38	8
	SAMN25849904	United Kingdom	Clinical	2021	38	-

Continent	BioSample	Location	Isolation type	Year	MLST Achtman	MLST Pasteur
Europe	SAMN30467461	Switzerland	Clinical	2022	38	8
	SAMEA7746154	Netherlands	Clinical	2012	69	-
	SAMN14640107	Spain	Clinical	2015	127	2
	SAMEA104083453	Ireland	Clinical	2016	131	8
	SAMN14640124	Spain	Clinical	2015	131	39
	SAMN17373121	Germany	Clinical	2019	131	32
	SAMN17373186	Netherlands	Clinical	2019	131	8
	SAMN37200064	United Kingdom	Clinical	2022	131	43
	SAMEA5587335	United Kingdom	Clinical	2019	156	88
	SAMEA4786452	Germany	Clinical	2019	162	-
	SAMN15344979	Spain	Clinical	2015	167	39
	SAMEA4916081	Switzerland	Clinical	2013	205	-
	SAMN24297019	United Kingdom	Clinical	2016	205	24
	SAMN24296944	United Kingdom	Clinical	2016	215	-
	SAMN24296985	United Kingdom	Clinical	2014	215	-
	SAMEA104305653	Ireland	Clinical	2017	227	-
	SAMN17373205	Netherlands	Clinical	2019	297	2
	SAMEA4727894	France	Clinical	2012	354	3
	SAMEA7746206	Netherlands	Clinical	2016	354	398
	SAMEA92061418	Spain	Clinical	2012	354	58
	SAMN14640123	Spain	Clinical	2014	354	8
	SAMN14640147	Spain	Clinical	2015	354	2
	SAMN15344965	Spain	Clinical	2015	354	2
	SAMN17372998	Germany	Clinical	2019	354	8
	SAMN17373176	Netherlands	Clinical	2019	405	8
	SAMEA104077107	Ireland	Clinical	2016	410	471
	SAMEA104077432	Ireland	Clinical	2016	410	-
	SAMEA111435712	Norway	Clinical	2015	410	471
	SAMEA9000366	France	Clinical	2009	410	-
	SAMEA90400918	Ireland	Clinical	2016	410	-
	SAMN04158312	Norway	Clinical	2013	448	8
	SAMN04158294	Norway	Clinical	2012	453	349
	SAMEA4916030	Switzerland	Clinical	2016	648	19
	SAMEA7048353	France	Clinical	2021	648	355
	SAMEA7746148	Netherlands	Clinical	2011	648	43
	SAMN17373089	Germany	Clinical	2019	648	-
	SAMN17373165	Netherlands	Clinical	2016	648	8
	SAMEA90403168	Ireland	Clinical	2016	1288	8
	SAMN28857201	Germany	Clinical	2017	1607	-
	SAMEA104289864	Ireland	Clinical	2017	4450	8
	SAMEA4727979	France	Clinical	2011	11672	-
	SAMN17214840	Switzerland	environmental	2015	38	39
	SAMN17214841	Switzerland	environmental	2021	38	8

Continent	BioSample	Location	Isolation type	Year	MLST Achtman	MLST Pasteur
Europe	SAMN26427732	United Kingdom	environmental	2022	38	8
	SAMN18062621	Switzerland	environmental	2019	167	-
	SAMN26427724	United Kingdom	environmental	2022	354	39
	SAMN22551384	Switzerland	environmental	2020	453	-
	SAMN18062623	Switzerland	environmental	2019	648	8
	SAMN13951918	Switzerland	environmental	2019	7401	471
	SAMN26427717	United Kingdom	environmental	2022	11260	-
	SAMN19036486	Switzerland	environmental	2020	-	8
Oceania	SAMEA3357475	Australia	Clinical	2014	38	8
	SAMN28668604	Australia	Clinical	2020	38	8
	SAMN28744055	Australia	Clinical	2018	38	8
	SAMN20033097	Australia	Clinical	2017	131	535
	SAMN31262658	Australia	Clinical	2017	354	8
	SAMN20033160	Australia	Clinical	2018	1286	-
	SAMN20033368	Australia	Clinical	2020	2003	-
	SAMN09866932	Australia	Clinical	2017	2851	-
	SAMN20033285	Australia	Clinical	2019	3268	-
	SAMN20033180	Australia	Clinical	2018	9008	-

Nota. Los aislamientos presentados en la tabla corresponden únicamente a origen ecuatoriano y los mismos fueron obtenidos de la plataforma de NCBI. El aislado marcado de color amarillo pertenece al aislamiento de la cepa *E. coli* 17A con el gen *bla*_{OXA-48}.