

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS DIRECCIÓN DE POSGRADO

MAESTRÍA EN AGRONOMÍA MENCIÓN CAMBIO CLIMÁTICO

Tema: Presencia de enterobacterias portadoras de genes de resistencia a antibióticos emergentes procedentes de aguas de riego y superficiales del Ecuador, año 2019.

Trabajo de titulación previo a la obtención del grado académico de
Magister en Agronomía Mención Cambio Climático

Autor: Ingeniero Agr. David Israel Mendoza León

Director: Quím. William Ricardo Calero Cáceres, PhD.

Ambato – Ecuador

2019

A la Unidad Académica de Titulación de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

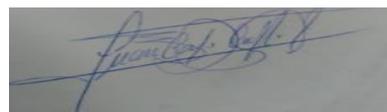
El Tribunal receptor del Trabajo de Investigación, presidido por el Ingeniero Marco Pérez Salinas Magíster, e integrado por los señores Ing. Michel Leiva Mora PhD y Ing. Juan Carlos Coello Peñafiel Magister designados por la Unidad Académica de Titulación de la Universidad Técnica de Ambato, para receptor el Trabajo de Investigación con el tema: PRESENCIA DE ENTEROBACTERIAS PORTADORAS DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EMERGENTES PROCEDENTES DE AGUAS DE RIEGO Y SUPERFICIALES DEL ECUADOR, AÑO 2019, elaborado y presentado por el Ingeniero Agrónomo David Israel Mendoza León, para optar por el Grado Académico de Magíster en Agronomía mención Cambio Climático; una vez escuchada la defensa oral del Trabajo de Investigación; el Tribunal aprueba y remite el trabajo para uso y custodia en las bibliotecas de la UTA.



Ing. Marco Pérez Salinas Mg.
Presidente del Tribunal



Ing. Michel Leiva Mora PhD
Miembro del Tribunal



Ing. Juan Carlos Coello Peñafiel
Miembro del Tribunal

AUTORÍA DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

La responsabilidad de las opiniones, comentarios y críticas emitidas en el Trabajo de Investigación, presentado con el tema: “PRESENCIA DE ENTEROBACTERIAS PORTADORAS DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EMERGENTES PROCEDENTES DE AGUAS DE RIEGO Y SUPERFICIALES DEL ECUADOR, AÑO 2019”, le corresponde exclusivamente a: Ingeniero Agrónomo David Israel Mendoza León, Autor bajo la Dirección del Químico William Ricardo Calero Cáceres PhD, Director del Trabajo de Investigación; y el patrimonio intelectual a la Universidad Técnica de Ambato.



Ingeniero Agrónomo David Israel Mendosa León

C.I: 1804801346

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que el Trabajo de Investigación, sirva como un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos de mi trabajo, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad.



Ingeniero Agrónomo David Israel Mendosa León

C.I: 1804801346

INDICE GENERAL

CAPÍTULO I.....	1
1.1. Introducción.....	1
1.2. Justificación.....	2
1.3. Objetivos	3
1.3.1. General	3
1.3.2. Específicos	3
CAPÍTULO II	4
2.2. Estado del Arte	4
CAPÍTULO III.....	8
3.1. Metodología.....	8
3.1.1. Tipo de Investigación.....	8
3.1.2. Hipótesis	8
3.1.3. Población y muestra.....	8
3.1.4. Localización del Laboratorio	10
3.1.5. Descripción de los instrumentos utilizados	11
3.1.6. Descripción y operacionalización de variables.....	14
3.1.7. Preparación de muestras y aislamiento	16
3.1.7.3. Generación de biomasa y criopreservación	17
3.1.8. Extracción de ADN bacteriano	17
3.1.10. Visualización de genes amplificados en gel de Agarosa	19
3.1.11. Recolección de la información	20
CAPÍTULO IV	21
4.1. Resultados	21
4.1.1. Evaluación de la presencia de genes de resistencia a antibióticos emergentes por PCR.	21
4.1.2. Gráfica de los geles de los ARGs por medio de la PCR multiplex.	23
4.2. Discusión	29
CAPÍTULO V.....	33
5.1. Conclusiones	33
5.2. Recomendaciones	33
BIBLIOGRAFÍA.....	35
ANEXOS	41

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Primers y secuencia genética para amplificación.....	18
Tabla 2. Presencia o ausencia de genes.....	20
Tabla 3. Perfil fenotípico de resistencia a antibióticos.....	26
Tabla 4. Aislamientos positivos detectados por técnica de PCR.....	28
Tabla 5. Identificación de los aislamientos por prueba de Maldi-Tof.....	29
Tabla 6. Descripción de las muestras positivas.....	30

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Descripción de los parámetros tomados en cuenta para la toma de muestra (análisis espacio-temporal).....	9
Figura 2. Puntos de Muestreo de las 5 provincias del Ecuador.....	10
Figura 3. Validación de método de genes (pares de base) para la Estandarización de primers más dos controles (+) y (-) mediante la técnica de PCR-Multiplex....	22
Figura 4. Amplificación de muestras individuales en gel de agarosa, concentración 1% para el gen <i>mcr-1</i>	23
Figura 5. Amplificación de muestras individuales en gel de agarosa, concentración 1% para el gen <i>mcr-1</i>	24
Figura 6. Amplificación de muestras individuales en gel de agarosa, concentración 1% para el gen <i>bla_{VIM}</i>	24
Figura 7. . Amplificación de muestras individuales en gel de agarosa, concentración 1% para el gen <i>bla_{KPC}</i>	25

AGRADECIMIENTOS

Un gran agradecimiento a todas las personas que fueron parte de este logro, a la Universidad Técnica de Ambato, en especial a la Facultad de Ciencias Agropecuarias que me abrió las puertas en formación profesional, trabajo y ahora un posgrado

Un agradecimiento sincero y profundo a todos los profesores que formaron parte de esta maestría. Especialmente quiero agradecer a mi Director de tesis y de proyecto de investigación, William Ricardo Calero Cáceres, PhD por toda la confianza depositada, a quien con su amplio conocimiento, enseñanzas y voluntad ha permitido culminar con éxito la presente investigación. Mis mejores deseos en su vida profesional

Agradezco infinitamente a Ing. Mg. Hernán Zurita, ex Decano de la Facultad de Ciencias Agropecuarias por creer en mis capacidades y brindarme la oportunidad de aprender y trabajar en e Investigación por tres años.

Agradezco a ese gran grupo de trabajo, de sincera amistad y más conformado por la Martha, Carlos, Lili, Vane, Nathy, Majo y Ely, por cada risa, lágrimas y momentos compartidos. Siempre estarán en mis pensamientos.

Por último, agradezco a mis mejores amigos Danny (Pastel), Negro Daniel, Cristian (Grone), Paúl (Dubo) y

DEDICATORIA

Mi dedicatoria a nuestro creador Dios por haberme bendecido con salud, una familia maravillosa y por brindarme la oportunidad de culminar con éste posgrado. A mis compañeros de vida mis padres Tito y Berthita que me han llenado de amor, consejos, buenos valores y su apoyo incondicional a cada momento. Espero tenerlos siempre!

A mi hermana Dayana. Te amo.

A mi tia Bachita, Mamita Lucy y mi abuelita mamita Diva por ser una parte importante en mi formación como persona. Me regalaron su tiempo para tener una inigualable infancia

En especial quiero dedicar este sacrificio, trabajo y tiempo a mis tíos abuelos María (+) y Toñito (+) que con lágrimas en los ojos los extraño mucho, pero que al mismo tiempo tengo la certeza que me acompañan en cada momento, son mis angelitos y están desde el cielo velando por el bienestar de todos.

La mente de cada persona puede percibir todos los miedos y tormentos. Pero al hacerlo con el corazón, ella tiene una gran y valiosa aliada. Todo eso es...

¡SABER VIVIR!

Charles Chaplin.

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
MAESTRÍA EN AGRONOMÍA MENCIÓN CAMBIO
CLIMÁTICO

TEMA

PRESENCIA DE ENTEROBACTERIAS PORTADORAS DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EMERGENTES PROCEDENTES DE AGUAS DE RIEGO Y SUPERFICIALES DEL ECUADOR, AÑO 2019.

AUTOR: Ingeniero Agrónomo David Israel Mendoza León

Director: Químico William Ricardo Calero Cáceres, PhD.

FECHA: Veinte y ocho de enero del 2019

RESUMEN

Con la finalidad de evaluar el grado de contaminación biológico de ciertos cuerpos de agua del país, se planteó la identificación de bacterias resistentes a antibióticos emergentes, procedentes de aguas superficiales de 5 provincias del Ecuador. Los puntos de muestreo para el análisis fueron determinados en base a un estudio espacio-temporal, basado en datos históricos por el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI); según la presencia de población, hospitales, cultivos, producción animal e industrias. La recolección de muestras se realizó de ríos, canales de riego, puntos de captación. Se tomaron alrededor de 71 muestras en puntos estratégicos basados en las Normas US EPA-600/4-79-0120 "Métodos para la Recolección y Análisis de Agua y Residuos", de las cuales 40 (24 de río y 16 del canal de riego) correspondieron a agua y 31 muestras (16 de río y 15 del canal de riego) correspondían a sedimentos. Se realizaron siembras en agar Chromocult® y MacConkey enriquecidos con 2 µg de Ceftriaxona. De las muestras, fueron cuantificados los indicadores de contaminación fecal *E. coli* y coliformes totales, así como *E. coli* y coliformes totales resistentes a ceftriaxona (2 µg/mL). Se realizó la detección de 10 genes (*mcr-1 mcr-2 mcr-3 mcr-4 mcr-5, bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{IMP} y bla_{VIM}*) de resistencia a antibióticos en el proceso de PCR, mediante la confirmación de amplificación se identificaron 9

aislamientos positivos a los genes de resistencia a antibióticos emergentes (8 para *mcr-1* y, 1 para *bla_{KPC}*).

Palabras clave: Contaminación, *Escherichia coli*, genes de resistencia, Aguas Superficiales, Sedimentos, PCR.

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
MAESTRÍA EN AGRONOMÍA MENCIÓN CAMBIO
CLIMÁTICO

THEME

PRESENCE OF ENTEROBACTERIA CARRYING GENES OF RESISTANCE TO EMERGING ANTIBIOTICS FROM IRRIGATION WATERS AND SURFACES OF ECUADOR, YEAR 2019.

AUTHOR: Ingeniero Agrónomo David Israel Mendoza León

DIRECTED BY: Químico William Ricardo Calero Cáceres, PhD.

DATE: January 28th, 2019

EXCECUTIVE SUMMARY

In order to assess the degree of biological pollution of water in the country, the aim of this researching was the identification of bacteria resistant to emerging antibiotics from surface waters of 5 provinces of Ecuador. The sampling points for the analysis were determined based on a space-temporal study, based on historical data by the National Institute for Public Health Research (INSPI) based on to the presence of population, hospitals, crops, animal production and industries. The collection of samples was carried out from rivers, irrigation canals, collection points. About 71 samples were taken at strategic points based on US EPA-600 / 4-79-0120 "Methods for the Collection and Analysis of Water and Waste", of which 40 (24 from the river and 16 from the irrigation canal) corresponded to water and 31 samples (16 from the river and 15 from the irrigation canal) corresponded to sediments. Seeds were performed on Chromocult® and MacConkey agar enriched with 2 µg of Ceftriaxone. From the samples, the indicators of faecal contamination were *E. coli* and total coliforms, thus *E. coli* and ceftriaxone resistant total coliforms (2 µg / mL). 10 genes (*mcr-1 mcr-2 mcr-3 mcr-4 mcr-5, blaKPC, blaNDM, blaIMP* and *blaVIM*) were detected for antibiotic resistance in the PCR process, by

confirming the amplification they were identified and identified 9 positive isolates to emerging antibiotic resistance genes (8 for mcr-1 and, 1 for blaKPC).

Key words: Pollution, *Escherichia coli*, resistance genes, Surface Waters, Sediments, PCR.

CAPÍTULO I

1.1. Introducción

El agua representa un recurso vital para el desarrollo y el mantenimiento de la mayor parte de las formas de vida. América Latina dispone de una cantidad de agua por habitante mucho mayor de la que disponen otros continentes (FAO, 2019). Este recurso es de gran importancia para la población; ya sea para consumo, uso doméstico, producción de alimentos o para fines recreativos (OMS, 2010). Es utilizada en sectores como la industria y minería, como generador de energía por represas y en la producción agrícola, forestal y pesquera; siendo la agrícola la de mayor impacto en el uso y aprovechamiento de este recurso (FAO, 1993).

El crecimiento de la población, conjuntamente con el mal manejo de prácticas industriales y agropecuarias son los principales causantes de contaminación hídrica. Owa (2013) asegura que los desechos industriales, en forma de aguas residuales, representa el mayor contaminante de acuíferos, ríos y lagos. Las aguas residuales reflejan los desperdicios de alcantarillado urbano; y la presencia de microorganismos entéricos en el medio ambiente; como bacterias, parásitos, virus y hongos, se debe principalmente a las descargas de aguas residuales no tratadas (McLellan y Eren 2014). Los servicios de saneamiento inexistentes o gestionados de forma deficiente exponen a la población a riesgos prevenibles para su salud (OMS, 2010). Prácticas convencionales como la disposición inadecuada de excretas de origen humano y animal, la movilización de animales por pastoreo y manejo de cultivos, abonos orgánicos mal procesados afectan la calidad microbiológica de las vertientes y afluentes hídricos (Ríos-Tobón, et al, 2017).

Durante muchos años, se ha utilizado antibióticos con el fin de mitigar y tratar enfermedades de origen bacteriano en el ser humano, con alta efectividad. Debido al uso indiscriminado de los mismos tanto en el ser humano, en la agricultura y ganadería se ha perdido la eficacia de los tratamientos con antibióticos, debido a la aceleración en el ritmo evolutivo bacteriano y a la generación de mecanismos de resistencia a antibióticos más avanzados (Gil, 2012); motivo por el cual, la Organización Mundial de la Salud propone estrategias globales para enfrentarse al

problema considerando una estrategia multidisciplinaria, que incluya a diversos sectores como la salud humana y animal, ambiental, alimentaria y consumo.

1.2. Justificación

En los objetivos de Desarrollo del Milenio para esta década, el garantizar la sostenibilidad del medio ambiente es uno de los más ambiciosos (WHO, 2019). El agua contaminada y el saneamiento deficiente influyen la disponibilidad de agua para consumo; afectando a ecosistemas, procesos naturales y producción de alimentos (Queenan et al. 2016). En Latinoamérica, a pesar de ser una de las regiones más ricas en recursos hídricos; aproximadamente 37 millones de personas no tienen acceso a un suministro seguro de agua potable, y alrededor de 110 millones no tienen acceso a sistemas de sanitización adecuados (Ríos-Tobón, et al, 2017).

Ecuador dispone de suficiente caudal de agua en todas las regiones. En la actualidad no existen suficientes estudios de monitoreo en ríos, canales de riego y fuentes de descarga directa para el control de niveles de contaminación del recurso hídrico (Voloshenk et al., 2015). La escasa información existente se basa en investigaciones realizadas por Universidades, Empresas privadas y organizaciones no gubernamentales (Calles, 2012). En tal problemática es fundamental el levantamiento de información sobre contaminación que se origina en el inadecuado manejo de este recurso y que termina en canales de riego, ríos y acuíferos.

La presente investigación tiene como objetivo determinar la presencia de enterobacterias portadoras de genes de resistencia a antibióticos emergentes procedentes de aguas de riego de uso público y superficial de puntos de importancia en el Ecuador. Considerando estos antecedentes, es prioritario el estudio de estos determinantes de resistencia en el medio ambiente, lo cual permitirá identificar el nivel de diseminación de estos organismos en el país, así como el seguimiento y caracterización de estos determinantes de resistencia emergente permitirá prevenir la diseminación de los mismos, y alertará sobre determinadas malas prácticas de gestión de residuos urbanos, animales, agrícolas e industriales.

1.3.Objetivos

1.3.1. General

Evaluar la presencia de enterobacterias portadoras de genes de resistencia a antibióticos emergentes procedentes de aguas de riego y superficiales del Ecuador durante el año 2019.

1.3.2. Específicos

- Seleccionar los puntos de muestro en base a un análisis espacio-temporal de los parámetros de población circundantes y uso de suelo.
- Realizar el aislamiento selectivo de enterobacterias a partir de aguas y sedimentos de ríos y canales de riego de cinco provincias del Ecuador.
- Identificar las enterobacterias portadoras de genes de resistencia a antibióticos emergentes por técnicas moleculares.

CAPÍTULO II

2.2. Estado del Arte

Debido a la gestión inadecuada en zonas urbanas y aguas residuales agrícolas millones de personas en el mundo están expuestas a niveles peligrosos de contaminantes biológico (WHO, 2019). En países en desarrollo, se estima que 700 millones de personas no tienen acceso a agua limpia para consumo. En países desarrollados el consumo de agua contaminada no tratada provocan alrededor de 14,000 muertes por día (Owa, 2013). Mientras que según la Organización Mundial de la Salud, se estima que a nivel mundial el 80% de las aguas residuales se descargan directamente hacia cuerpos de agua (FAO, 2017). Con el fin de erradicar y combatir con esta problemática se han propuesto medidas de acción como: Elaborar planes estratégicos que incluya medidas preventivas eficaces a nivel de finca, fortalecer los sistemas de vigilancia mediante censos y controles fitosanitarios en poblaciones humana y fincas ganaderas y por último, fortalecer el conocimiento de la ecología bacteriana y sus genes resistentes mediante campañas de concientización (Minnesota Department of Health,. 2017)

Los asentamientos humanos en zonas de conservación y vertientes de agua; así como las actividades agrícolas, pecuarias y la industria son los principales responsables de la contaminación de agua (FAO, 2017). Por su parte, Owa (2013) asegura que el agua caliente resultante del enfriamiento de motores en el sector de la industria es descargada directamente a ríos o vertientes, acción que provoca la disminución de poblaciones de microorganismos y aumento de la demanda de oxígeno para el enfriamiento y procesos metabólicos de flora y fauna en el ambiente. La liberación de antibióticos en cantidades descomunales hacia acuíferos o vertientes de agua, alterando de esta manera la dinámica de poblaciones microbianas y causando resistencia a antibióticos utilizados con mayor frecuencia (Mero, 2018).

La presencia de productos químicos farmacéuticos (antibióticos) en el medio acuático ha sido reconocida como una preocupación ambiental, ya que entre las principales vías de propagación hacia el medio ambiente son a través de la

excreción humana y por el uso agrícola (Gil., et al. 2012). Por lo que, el sector de la agricultura, que representa el 70 por ciento de las extracciones de agua en todo el mundo, representa uno de los principales afectados por la contaminación del agua. El sector de la ganadería, el cual descarga grandes cantidades de agroquímicos, materia orgánica, residuos de antibióticos y otros contaminantes, representa también otra fuente significativa de contaminación antropogénica (Fao, 2017).

Un estudio de la PNUMA (2013) afirma en que el uso de fármacos contra microorganismos patógenos en animales y humanos ha aumentado considerablemente; esto se debe al incremento de la población y a la necesidad urgente de satisfacer necesidades de alimentación, salud y vivienda. Por lo tanto, se incrementa las descargas sobre ríos, lagos y vertientes de agua contaminada. Estos antibióticos modifican la estructura del microbioma ambiental, alterando las poblaciones autóctonas y estimulando la generación de mutaciones, o bien, sobre procesos de transferencia genética horizontal (HGT) (Calero-Cáceres 2016). Entre los antibióticos más utilizados en el sector del agricultura y ganadería están las tetraciclinas, los aminoglicósidos, los macrólidos y los betalactámicos (Wright, 2007).

Entre los antibióticos considerados prioritarios por la OMS tenemos a la colistina, el cual es un antibiótico de uso general, utilizado principalmente en la medicina humana y veterinaria. Es un polipéptido cíclico perteneciente al grupo de las polimixinas, que por sus propiedades tensoactivas tiene la capacidad de alterar la permeabilidad de la pared de las bacterias Gram negativas sensibles (European Medicines Agency 2013); hace poco se sabía que la resistencia a éste antibiótico era por mutaciones a nivel de los cromosomas. (Medina J, et al. 2017). La importancia de este antibiótico radica en el elevado uso en animales para tratar enfermedades de origen bacteriano de la familia *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*), *Acinetobacter baumannii* (MDR), resistente a múltiples fármacos (Catry *et al.*, 2015). Debido a su toxicidad, su uso en humanos es limitado para aquellas infecciones en las cuales los tratamientos comunes no son efectivos.

El mecanismo de resistencia bacteriano a colistina se debía principalmente a elementos genéticos presentes dentro de los cromosomas bacterianos. Sin embargo, desde el año 2015 se detectó un incremento en los patrones de resistencia a colistina en China, cuya investigación epidemiológica determinó que estos aislamientos portaban un nuevo mecanismo de resistencia a colistina a través de plásmidos, relacionado al gen *mcr-1* (Mobile Colistin Resistance) (OPS, 2016). Desde esta fecha, se ha presentado una diseminación global de este gen a lo largo del mundo, modificando los patrones de resistencia y aumentando el peligro potencial de episodios de evolución y diseminación de resistencia a un antibiótico considerado prioritario para la salud humana (Medina et al., 2017).

El primer reporte de *mcr-1* fue entre el mes de abril del 2011 y noviembre del 2014, el estudio consistió en analizar de 523 muestras de carne cruda las cuales 78 fueron portadoras de *mcr-1*, 804 muestras de animales siendo 166 portadores de este gen y finalmente se analizaron 1.322 muestras de pacientes hospitalizados con infección, de los cuales 16 resultaron portadores de gen *mcr-1* (OPS, 2016). A nivel mundial, se han reportado brotes causados por microorganismos portadores de este gen; si bien el riesgo mayor que se enfrenta es la diseminación de este gen mediante plásmidos a otras cepas más virulentas o incluso a clones hiperepidémicos (Aguayo et al., 2016). Al presentarse esta situación, existe una gran preocupación acerca del mantenimiento de la colistina como estrategia farmacológica a mediano plazo.

En el Ecuador el primer reporte de *mcr-1* fue mediante un aislamiento clínico de *E. coli* que albergaba el gen (Ortega Paredes & Zurita, 2016). Desde esa fecha, han sido detectados aislamientos portadores de este gen en diferentes matrices, como animales de producción y de compañía (Ortega Paredes & Zurita, 2016). Hasta el momento, no se han reportado aislamientos de origen ambiental en el país.

Con todos estos antecedentes, se hace necesario estudiar las fuentes de agua en Ecuador y conocer si existe la diseminación de cepas de *E. coli* con genes de resistencia a antibióticos de amplio espectro, contribuyendo así en la medida de lo posible a la mejora de la seguridad alimentaria, disminuir los efectos de cambio

mático por la mutación de bacterias patógenas y por ende asegurar una buena calidad de vida a la población del país.

CAPÍTULO III

3.1. Metodología

3.1.1. Tipo de Investigación

La presente se trata de una investigación experimental con un enfoque cualitativo y cuantitativo (mixto).

3.1.2. Hipótesis

H1: La presencia de determinantes de resistencia a antibióticos emergentes en Enterobacterias aisladas en los canales de riego y aguas superficiales del Ecuador, 2019 es positiva.

3.1.3. Población y muestra

El protocolo de recolección de muestras de aguas a seguir está basado en las Normas US EPA-600/4-79-0120 "Métodos para la Recolección y Análisis de Agua y Residuos". Los puntos de muestreo fueron seleccionados en base a un análisis espacio - temporal, considerando aspectos como cantidad de población, actividad agrícola, presencia de industrias, hospitales y descargas directa de agua residuales.

La muestra de agua que se recolectó fue de tipo simple, tomada de la superficie y se la recolectó en un frasco estéril (500 mL por punto) (Quingaluisa, 2019). Para la toma de muestra de sedimento, se recolectó 100 g aproximadamente. Se tapó el frasco y se transportó al laboratorio a una temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el lapso no mayor a 12 horas desde la toma de muestra para la cuantificación microbiana. Adicional se tomó nota de la descripción del lugar en el cual se ha recolectado la muestra y la ubicación exacta por medio de GPS. En cada punto, las se tomaron por triplicado, con intervalos de 1 minuto entre muestras, de acuerdo al protocolo de muestreo de Lekunberri, Balcázar & Borrego (2018).

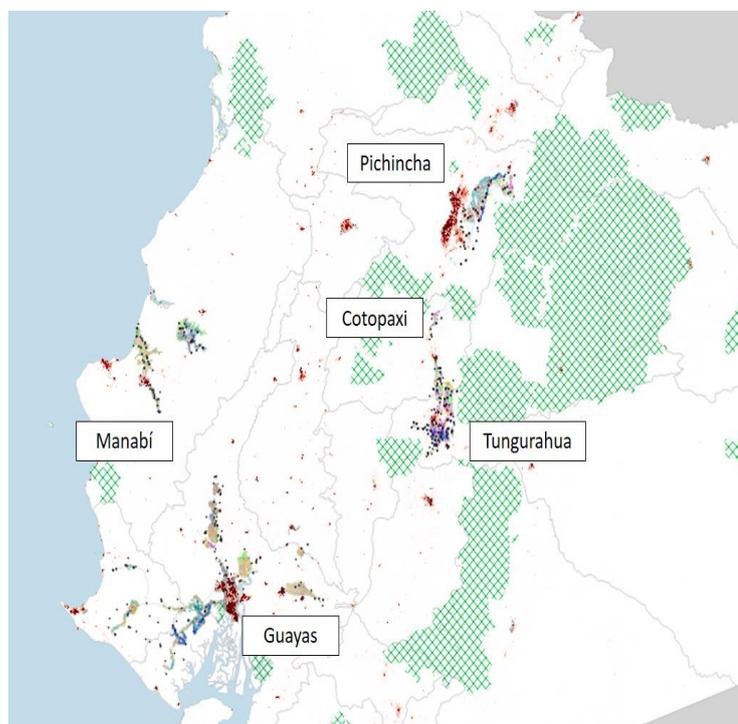
Los parámetros para la toma de muestra se consideraron realizarlas antes, durante y después del centro poblado, con la finalidad de evaluar el efecto de la población sobre las densidades de microorganismos en el agua y los sedimentos. Además, por medio de un análisis espacio-temporal de los parámetros de uso de suelo y de población humana. Este análisis fue ejecutado por el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) y la Universidad Técnica de Ambato. El software utilizado fue QGIS 2018. La descripción de los parámetros considerados se la describen en el Gráfico N.-1 y la descripción de los puntos de muestreo se detalla en el gráfico N.-2.

Figura 1. Descripción de los parámetros tomados en cuenta para la toma de muestra (análisis espacio-temporal).



Elaborado por: Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) y la Universidad Técnica de Ambato

Figura 2. Puntos de Muestreo de las 5 provincias del Ecuador.



Elaborado por: Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) y la Universidad Técnica de Ambato.

3.1.4. Localización del Laboratorio

Esta investigación en la Facultad de Ciencias Agropecuarias, en el cantón Cevallos, provincia de Tungurahua, ubicado a una altitud de 2855 msnm, a una latitud de 1° 25' 0" S., longitud de 78° 35' 22" O., con una temperatura máxima de 18° C., mínima de 12° C. y una humedad relativa del 53%.

Para el experimento se utilizó los laboratorios de investigación de microbiología agrícola y ambiental y, biología molecular y microbiología veterinaria. Estos laboratorios utilizados cuentan con condiciones de ambiente controlados, con temperaturas promedio de 20 ± 2 °C y una humedad relativa de $48 \pm 2\%$. Las

reacciones moleculares se detallan para cada uno de los experimentos en el apartado 7.1 de la sección de anexos

3.1.5. Descripción de los instrumentos utilizados

3.1.5.1. Instrumentos del Laboratorio

Material	Cantidad
Aguja de siembra Acero inoxidable	1
Asa de siembra Acero inoxidable 3 mm	3
Asa de Drigalski vidrio 150x5 mm	3
Cajas para puntas	5
Cajas Petri de 90 mm	650
Espátula metálica	2
Frascos schott tapa azul autoclavables (1000 mL, 500 mL, 100 mL)	10
Gradillas para tubos 15 mm	6
Matraz Erlenmeyer de 500 mL	2
Mechero Bunsen	2
Mechero de alcohol	2
Micropipetas automáticas (1000 μ L, 200 μ L, 10 μ L)	3
Pera de succión	1
Pipetas desechables de plástico de 10 mL	1000
Probetas graduadas	5
Puntas de micropipeta amarillas de 2 – 200 μ L	500
Puntas de micropipeta azules de 100 – 1000 μ L	5000
Puntas de micropipeta blancas de 0.1 – 10 μ L	3000
Tubos de ensayo	150
Tubos eppendorf de 0.2 ml	1000
Tubos eppendorf de 1.5 ml	1000
Vasos de precipitados	5

3.1.5.2. Equipos de laboratorio

Equipo	Cantidad
Agitador Vortex	1
Autoclave M11 Ultraclave MIDMARK	1
Balanza analítica Cap. 150 g.	1
Baño maría 5°C-100°C	1
Cabina de flujo laminar de bioseguridad II	1
Cámara de electroforesis OWL Easycast	2
Fuente de poder para cámaras de electroforesis	1
Incubadora bacteriológica 5°C-100°C	1
Microondas	1
Microcentrífuga Sorvall Legend Micro i7	1
pH-Metro digital	1
Refrigerador -20 °C - 4°C	2
Termociclador Life Technologies Simple Amp	1
Transiluminador UV enduro TM GDS Tower	1

3.1.5.3. Insumos de laboratorio

Insumo	Cantidad
Alcohol antiséptico	1 galón
Algodón	500 gr.
Cinta adhesiva de papel	3 rollos
Cinta parafilm	1 rollo
Cloro 10 %	1 galón
Gasa 01x100 m.	1 paquete
Gel antibacterial	1 litro
Guantes de nitrilo	300 pares
Jabón líquido	1 litro
Mascarillas desechables	100
Nevera portátil de 10 litros	1

Papel aluminio	5 rollos
Papel craft	10 pliegos
Pirola de algodón	1 rollo

3.1.5.4. Reactivos de laboratorio

Detalle	Cantidad
Agar para coliformes microbiológico Chromocult® ®	500 gr.
Agar MacConkey	500 gr.
Agarosa en polvo	250 gr.
Agua de Peptona Tamponada (15 g/L)	250 gr.
Agua Mili-Q	500 ml
Agua ultrapura libre de nucleasas	10 ml
Buffer TBE 10X (Tris, Borato, EDTA)	250 ml
Ceftriaxona disódica estéril	10 gr.
Cloruro de potasio (KCl)	10 gr.
Cloruro de sodio (NaCl)	25 gr.
DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)	10 ml
Fosfato disódico (Na ₂ HPO ₄)	10 gr.
Phusion U Green Multiplex PCR Master Mix F564L (500 RX)	10 ml
Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	5 gr.
Trackit 100 bp dna ladder .	10 ml
TSB (caldo de triptona de soya)	1000 gr
Medio Christensen (Urea Agar Base)	250 gr.
Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	100 ml
Primers para PCR (Tabla 4)	20 u
Reactivo de Kovacs (Indol)	250 ml
SYBR Safe DNA Gel Stain	400 µL
TSI-Agar (triple azúcar hierro agar)	250 gr.

3.1.5.5. Materiales de Escritorio

Detalle	Cantidad
Bolígrafos	2
Cámara fotográfica	1
GPS	1
Computadora portátil y de mesa	1
Libreta de apuntes para laboratorio	1
Impresora	1
Paquete de papel bond A4	2

3.1.6. Descripción y operacionalización de variables

3.1.6.1. Factor en estudio

Genes de Resistencia Antimicrobiana:

- *bla_{KPC}*
- *bla_{NDM}*
- *bla_{IMP}*
- *bla_{OXA-48}*
- *bla_{VIM}*
- *mcr-1*
- *bla_{TEM}*
- *bla_{CTX-M}*
- *mcr-2*
- *mcr-3*
- *mcr-4*
- *mcr-5*

3.1.6.2. Tratamiento

Al ser un estudio descriptivo, se realizaron aislamientos selectivos de *E. coli* de muestras de aguas y sedimentos. Se evaluó la presencia de genes de resistencia en un banco de cepas aislado. Se tomaron alrededor de 71 muestras en puntos estratégicos basados en las Normas US EPA-600/4-79-0120 "Métodos para la

Recolección y Análisis de Agua y Residuos". Las provincias seleccionadas para éste estudio fueron: Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Manabí y Guayas.

3.1.6.3. Diseño Experimental

Debido a la naturaleza de la investigación se efectuaron estudios de estadística descriptiva, determinando la prevalencia de bacterias resistentes, tomando en cuenta intervalos de confianza con respecto a la existencia de genes de resistencia.

3.1.6.4. Variable respuesta

Identificación de los genes de resistencia *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* y *mcr-5*.

3.1.6.5. Toma de muestras

Las muestras fueron tomadas para el proyecto de investigación “Evaluación de la presencia de determinantes de resistencia a antibióticos emergentes en aguas de riego y superficiales del Ecuador, año 2018-2019”. Resolución HCU 0453-CU-P-2018, El trabajo antes mencionado consistió en recolectar muestras de 5 distintas provincias del país, las cuales 2 corresponden a la costa y 3 a la sierra. Los puntos seleccionados para el estudio fueron determinados en base a las Normas US EPA-600/4-79-0120 "Métodos para la Recolección y Análisis de Agua y Residuos". La cuantificación de indicadores de contaminación fecal de estas muestras fue realizada en el trabajo de Quingaluisa (2019), en su investigación previo a obtener el título de Ingeniero Bioquímico titulado “Cuantificación de indicadores de contaminación fecal en ríos y canales de agua de riego de cinco provincias del Ecuador”.

Se recolectaron un total de 71 muestras, de las cuales 40 (24 de río y 16 del canal de riego) correspondían a agua y 31 muestras (16 de río y 15 del canal de riego) correspondían a sedimento. Cada muestra contenía 100 mL de agua, las cuales se las transportó en neveras de conservación a una temperatura constante de 4°C

aproximadamente. Los parámetros tomados en los puntos de muestreo fueron coordenadas geográficas (GPS), temperatura y humedad; mientras que las muestras recolectadas fueron identificadas con información básica del punto de muestreo: nombre del sector, número de muestra, fecha de recolección y observaciones.

3.1.7. Preparación de muestras y aislamiento

3.1.7.1. Aislamiento de *E. coli* y de bacterias coliformes

La metodología utilizada está basada en la norma ISO 9308-1 (2014) para detección y enumeración de *E. coli* y bacterias coliformes en el agua.

Del banco de muestras elaborado por Quingaluisa (2019) se realizó la resiembra sobre placas con medio de cultivo Chromocult®, el cual es específico para coliformes. Se rotuló la caja con el nombre de la muestra, dilución y fecha. Se incubó aerobiamente las placas inoculadas en posición invertida a 35-37 °C. Después de la incubación, se examinó las placas para determinar la presencia de colonias violetas de *E. coli* y colonias rojas de bacterias coliformes.

3.1.7.2. Aislamiento de *E. coli* y de bacterias coliformes resistentes a ceftriaxona

Para la identificación de bacterias resistentes a ceftriaxona se procedió a colocar sobre la placa con medio de cultivo Chromocult® y MacConkey, al cual se agregó el antibiótico ceftriaxona (5 µg/mL), de amplio espectro frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas. Las placas rotuladas se incubaron aerobiamente en posición invertida a 35-37 °C. Después de la incubación, se examinó las placas para determinar la presencia de colonias violetas de *E. coli* y colonias rojas de bacterias coliformes totales.

3.1.7.3. Generación de biomasa y criopreservación

Se generó biomasa a partir de las muestras criopreservadas (Quingaluisa, 2019). Con el fin de reactivar las bacterias de cada muestra, se tomó 50 µL de muestra criopreservada y se la colocó en 5 mL de TSB con ceftriaxona, posteriormente fue incubada a 37 °C durante 24 horas aproximadamente. La biomasa generada fue transferida a un tubo eppendorf de 1.5 ml

3.1.8. Extracción de ADN bacteriano

3.1.8.1. Choques térmicos (ADN)

Se tomó 500 µL de la biomasa generada en nuevos tubos eppendorf. Para concentrar la biomasa en un pellet, los tubos eppendorf fueron sometidos a centrifugación de 5000 rpm/10 min. Al obtener el pellet con la ayuda de una pipeta de 20 µL se retiró el sobrenadante y añadió al pellet 500 µL de agua mili-Q (bio-destilada estéril) y finalmente sometida a vortex por 3 min con el fin de homogenizar el volumen de agua con el pellet

Las muestras se sometieron a choques térmicos: el mismo que consistió en someter a calor en baño maría (90°C/10 min), posterior a esto las muestras calientes se introdujeron en hielo (0°C/10 min) con el fin de romper la membrana celular y liberar el material genético. Finalmente, como un método de conserva las muestras se almacenaron a -20°C para su posterior uso en el proceso de PCR-Multiplex.

3.1.9. Técnica de PCR

Para la técnica de PCR por sus siglas en inglés (Reacción en Cadena de Polimerasa) se utilizó 16 primers, correspondientes a 8 genes, para detectar la presencia de diferentes genes resistentes a antimicrobianos. Los genes a evaluar fueron (*mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{VIM}*) Para la reacción se utilizó un volumen final de 25 µl por cada muestra.

Previamente a iniciar con la técnica PCR se preparó la cámara de bioseguridad (zona blanca) con material estéril nuevo, se descongelaron los choques térmicos almacenados.

Se tomaron 2.0 µL del sobrenadante (molde) y se añadieron 18µL de mezcla de PCR (10 µL Phusion U Green Multiplex PCR Master Mix F564L (500 RX) + 8 µL H₂O libre de nucleasas + 0.8x2 Primers 1 + 0.8x2 Primers 2) para PCR-Duplex.

Realizado la mezcla con la muestra se las llevó a vortex (spin) por 5 segundos y finalmente al termociclador. Cada ciclo de amplificación genética se modificó de acuerdo a los requerimientos de cada gen a analizar.

Tabla 1. Primers y secuencia genética para amplificación.

GEN	SECUENCIA 5' - 3'	Referencia
KPC-F	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	Poirel et al., 2011
KPC-R	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	Poirel et al., 2011
NMD-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	Poirel et al., 2011
NMD-R	CGGAATGGCTCATCACGATC	Poirel et al., 2011
IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	Poirel et al., 2011
IMP-R	GGTTTAAAYAAAACAACCACC	Poirel et al., 2011
OXA 48-F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	Poirel et al., 2011
OXA 48-R	CATCAAGTTCAACCCAACCG	Poirel et al., 2011
VIM-F	GATGGTGTTTGGTCGCATA	Poirel et al., 2011
VIM-R	CGAATGCGCAGCACCAG	Poirel et al., 2011
MCR1-F	GGGTGTGCTACCAAGTTTGC	Liu et al., 2016
MCR1-R	CATTGGCGTGATGCCAGTTT	Liu et al., 2016
MCR2-F	CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT	Rebelo et al., 2018
MCR2-R	TCTAGCCCGACAAGCATAACC	Rebelo et al., 2018
MCR3-F	AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG	Rebelo et al., 2018
MCR3-R	AATGGAGATCCCCGTTTTT	Rebelo et al., 2018

MCR4-F	TCACTTTCATCACTGCGTTG	Rebello et al., 2018
MCR4-R	TTGGTCCATGACTACCAATG	Rebello et al., 2018
MCR5-F	ATGCGGTTGTCTGCATTTATC	Borowiak et al., 2017
MCR5-R	TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG	Borowiak et al., 2017

3.1.10. Visualización de genes amplificados en gel de Agarosa

3.1.10.1. Preparación de gel de agarosa

Se preparó un gel de agarosa a 1% de concentración, el procedimiento fue en tomar 70 mL de TBE 1X (Tris-borato-EDTA buffer), añadir al mismo 0.7 g de agarosa, posterior a esto se agito manualmente y se fundió al calor por 2 min en un microondas. Una vez que la solución estuvo a temperatura corporal se añadieron 3 μ L de SybrSafe a la mezcla. Se vertió la mezcla en la cubeta de electroforesis y se colocó los peines, los cuales se formaron los pozos para depositar los genes amplificados.

3.1.10.2. Electroforesis

Previo a colocar el gel solidificado se llenó la cámara de electroforesis con TBE 1X (1%) hasta cubrir el gel por completo, con el fin de identificar la presencia de un gen por el número de pares de base, con una pipeta de 0 a 10 μ L se colocó en el primer pocillo 5 μ L de marcador molecular ladder de 100 bp,

En el segundo pocillo se colocaron 10 μ L de muestra de un gen específico como control positivo (+); en el tercer pocillo se colocaron 10 μ L de muestra control negativa (-) sin presencia de un gen. A partir del cuarto pocillo se colocaron las muestras analizadas en el termociclador. Finalmente se realizó un mapa de ubicación de las muestras colocadas en la cámara en el cuaderno de apuntes.

Con el fin de conseguir una adecuada separación de fragmentos de ADN de diferentes tamaños de pares de base y pesos moleculares, se utilizaron las siguientes

condiciones en la cámara de electroforesis: en el campo eléctrico con 90 voltios y 400 A amperios (Padilla *et al.*, 2006).

Tabla 2. Presencia o ausencia de genes.

zGen	Presencia genética	Ausencia genética
<i>bla_{IMP}</i>	+	-
<i>bla_{KPC}</i>	+	-
<i>bla_{NDM}</i>	+	-
<i>bla_{OXA48}</i>	+	-
<i>bla_{VIM}</i>	+	-
<i>mcr-1</i>	+	-
<i>mcr-2</i>	+	-
<i>mcr-3</i>	+	-
<i>mcr-4</i>	+	-
<i>mcr-5</i>	+	-
<i>tetA</i>	+	-

Elaborado por: (Autor, 2020)

3.1.11. Recolección de la información

Para el procesamiento adecuado de la información se utilizó el programa Microsoft Excel 2013.

CAPÍTULO IV

4.1. Resultados

Para el desarrollo de esta investigación se utilizó el banco de cepas obtenido del muestreo por Quingaluisa (2019). Para la selección de los diferentes puntos de muestreo se realizó un análisis espacio-temporal, considerando aspectos como: cantidad de población en la zona, distancia entre el punto a plantaciones agrícolas y pecuarias, descargas de desechos de hospitales e industrias. En Cada punto se observó la presencia de diferentes contaminantes de diferente procedencia como basura orgánica e inorgánica, animales muertos, restos de comida, desechos de hospitales, desechos de industrias, entre otros.

Quingaluisa (2019) realizó la cuantificación de los indicadores de contaminación fecal de *E. coli* y coliformes totales resistentes a ceftriaxona (2 µg/mL), los cuales se detallan en la tabla 6

Para la selección de microorganismos a analizar fueron seleccionadas las bacterias con un fenotipo de resistencia a ceftriaxona (cefalosporina de tercera generación). Las morfologías de las colonias seleccionadas son redondas y de color violeta en el agar Chromocult®, misma que nos permitió identificar la actividad de la enzima β-glucuronidasa, presente en la bacteria *E. coli*.

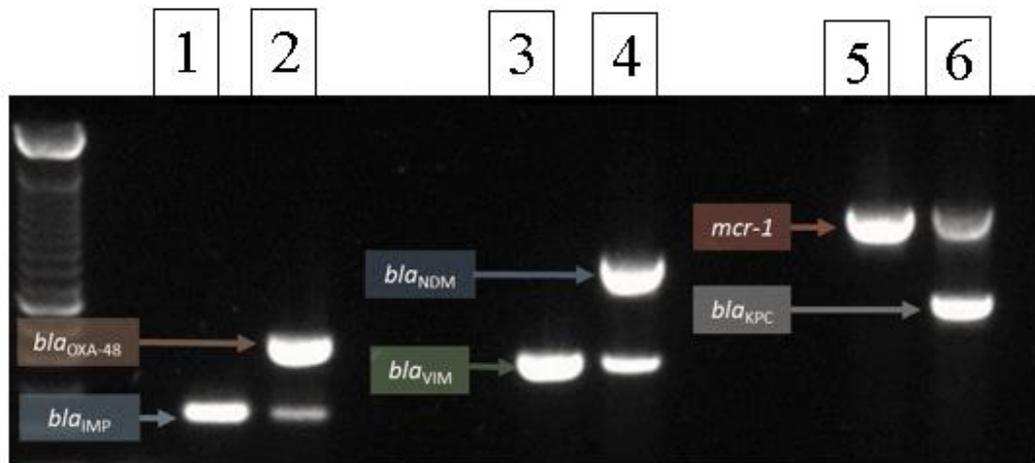
4.1.1. Evaluación de la presencia de genes de resistencia a antibióticos emergentes por PCR.

4.1.1.2. Puesta a punto de la técnica

Se realizó una estandarización de los cebadores y estándares adquiridos (Figura 3). El detalle de las condiciones finales estandarizadas se encuentra en el anexo 5. La técnica fue estandarizada a nuestras condiciones de laboratorio y equipos por medio de una amplificación específica del gen *bla_{IMP}*, con 232 bp, el gen *bla_{OXA48}*, con 438 bp, el gen *bla_{VIM}* con 390 bp, y el gen *bla_{KPC}* con 798 bp (Favier et al. 2010).

Además de la amplificación del gen *bla*_{NDM} con 621 bp (Nordmann et al. 2011); y el gen *mcr-1* con 1126 bp. La validación de las técnicas para los genes *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* y *mcr-5* fue realizada en el Laboratorio de Resistencia Antimicrobiana del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI. Se realizó la amplificación utilizando dos parejas de primers, cuyos amplímeros difieren en al menos 200 pb, para evitar solapamiento y la ausencia de amplificaciones inespecíficas.

Figura 3. Validación de método de genes (pares de base) para la Estandarización de primers más dos controles (+) y (-) mediante la técnica de PCR-Multiplex.



Como controles positivos para la reacción se utilizaron microorganismos portadores de genes de resistencia a carbapenems y colistina, los cuales fueron obtenidos por el INSPI. En la reacción 1 (primers OXA-48 e IMP), en la columna 1 fue utilizado el control positivo de *Enterobacter cloacae bla*_{VIM} (+), en la columna 2 una *E. cloacae bla*_{VIM} (+); mientras que para la reacción 2 (primers VIM y NDM), la columna 3 se trata de un control positivo de *P. aeruginosa bla*_{VIM} (+), en cuanto a la columna 4 contenía una mezcla de DNA de *P. aeruginosa bla*_{VIM} (+) y *Acinetobacter baumannii bla*_{NDM} (+); la reacción 3 (primers MCR-1 y KPC), la columna 5 contenía DNA de *K. pneumoniae mcr-1* (+) y la columna 6 una mezcla de DNA de *K. pneumoniae mcr-1* (+) y *Citrobacter freundii bla*_{KPC}.

Para la evaluación preliminar de las muestras, fueron elaboradas muestras compuestas a partir de los choques térmicos de los aislamientos del banco de cepas

elaborado por Quingaluisa (2019). El total de muestras a evaluar fueron 270 de las cuales se elaboró muestras compuestas de 5 muestras cada una, de tal manera que se obtuvo 54 muestras compuestas en total; posteriormente se realizó la extracción de ADN bacteriano por choques térmicos (proceso descrito en metodología). Finalmente, con el ADN bacteriano se realizó el proceso de la técnica de PCR. En los casos de obtener positivos a algún ARGs se analizó las muestras compuestas por individual, con el fin de identificar el origen del positivo encontrado.

Los resultados de las muestras compuestas analizadas para los genes *mcr-1*, *bla_{VIM}*, *bla_{TEM}* y *bla_{KPC}* son positivas; siendo positivas 8 muestras (7 de *E. coli*, 1 de *P. aeruginosa*) fueron positivos para el gen *mcr-1* (Gráfico 1 y 2), mientras que para el gen *bla_{VIM}* 3 fueron positivas (Gráfico 3), en lo que respecta al gen *bla_{KPC}* se detectó 1 muestra positiva (Gráfico 4) y finalmente 2 positivos para el gen *bla_{TEM}*. Mientas para los genes *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48}* y *bla_{IMP}* no se observó ningún tipo de amplificación, por lo tanto se determinó como negativos. Adicional se analizó los genes de resistencia a betalactamasas *bla_{TEM}*, obteniendo como resultado 2 amplificaciones positivas.

4.1.2. Gráfica de los geles de los ARGs por medio de la PCR multiplex.

Detección de los genes de resistencia

Figura 4. Amplificación de muestras individuales en gel de agarosa, concentración 1% para el gen *mcr-1*.



Figura 5. Amplificación de muestras individuales en gel de agarosa, concentración 1% para el gen *mcr-1*.

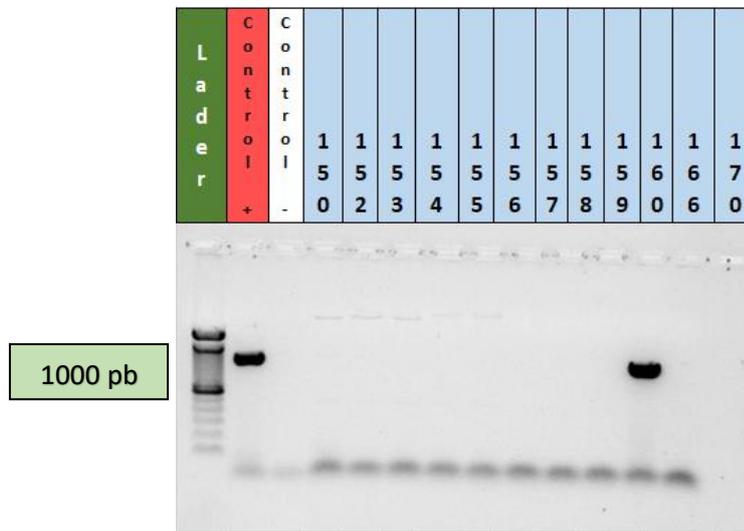


Figura 6. Amplificación de muestras individuales en gel de agarosa, concentración 1% para el gen *bla_{VIM}*

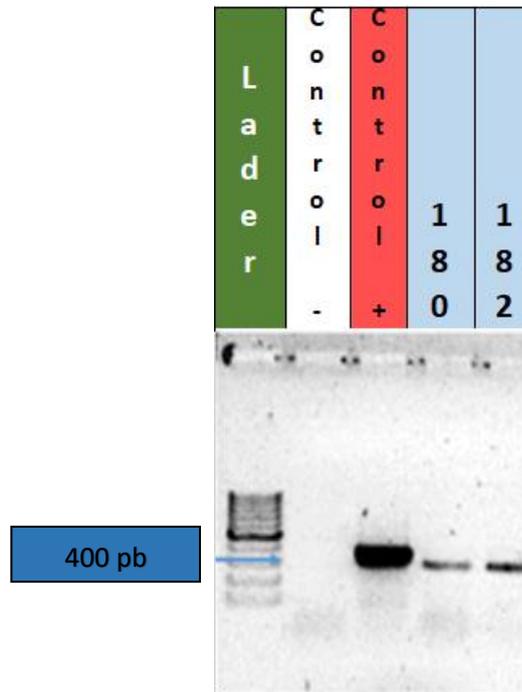


Figura 7. Amplificación de muestras individuales en gel de agarosa, concentración 1% para el gen *bla_{KPC}*

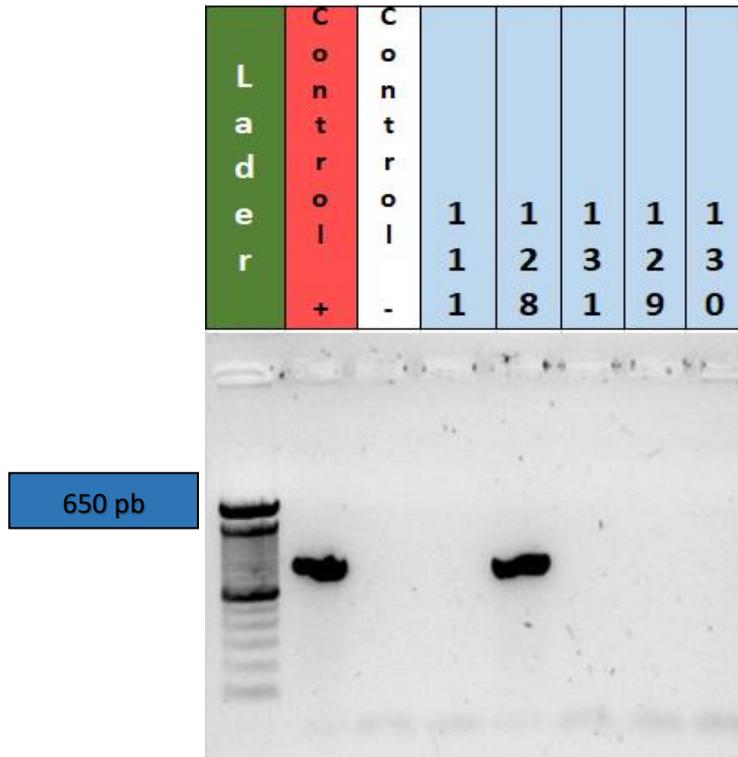


Tabla 3. Perfil genotípico de resistencia a antibióticos.

Para expresar la presencia de un gen en una muestra se utilizó el signo (+). Mientras que el (-) para expresar la ausencia de un gen en las muestras analizadas.

Nombre de la muestra	Origen	Fecha	N° Banco de muestras	Genes de Resistencia AGRs						
				<i>mcr-1</i>	<i>bla_{VIM}</i>	<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{KPC}</i>	<i>bla_{IMP}</i>	<i>bla_{NDM}</i>	<i>bla_{OXA48}</i>
Rio Cutuchi IESS	Rio Cutuchi. Latacunga sector IESS	20/8/2018	20	+	+	-	-	-	-	-
Sed Tosagua Manabí	Sedimento Rio Carrizal sector Tosagua	9/11/2018	128	-	-	-	+	-	-	-
Rio Cutuchi Sal	Rio Cutuchi Salcedo	20/8/2018	142	+	+	-	-	-	-	-
Sed Rio Cutuchi Latacunga	Rio Cutuchi Latacunga	20/8/2018	144	+	+	-	-	-	-	-
Ramal Manabi Por	Ramal Rio Portoviejo	9/12/2018	160	+	-	-	-	-	-	-
PC Rio cutichi	Punto de captación Rio Cutuchi Latacunga	11/2/2018	173	+	-	-	-	-	-	-
Rio Cutuchi Salcedo	Rio Cutuchi sector Salcedo	20/8/2018	174	+	-	-	-	-	-	-
Sed Canal AHP	Sedimento Canal Ambato-Huachi- Pelileo	3/9/2018	175	+	-	+	-	-	-	-
Rio Ambato puente	Rio Ambato puente la Delicia	5/8/2018	177	+	-	+	-	-	-	-

Elaborado por (Autor, 2020)

Se puede observar que los positivos para el gen *mcr-1* son negativos para el gen *bla_{IMP}* (productores de carbapenemas) que posee tres aislamientos positivos 20, 142 y 144; mientras que el aislamiento 177 fue positivo para el gen *mcr-1* y el gen *bla_{TEM}*. El gen *bla_{KPC}* es el menos detectado con solo un aislamiento positivo (128).

Tabla 4. Aislamientos positivos detectados por técnica de PCR

AISLAMIENTOS	Genes de resistencia antimicrobianos ARGs													
	<i>mcr-1</i>		<i>bla_{KPC}</i>		<i>bla_{NDM}</i>		<i>bla_{IMP}</i>		<i>bla_{OXA-48}</i>		<i>bla_{TEM}</i>		<i>bla_{VIM}</i>	
	Positivos	%Muestras	Positivos	%Muestras	Positivos	%Muestras	Positivos	%Muestras	Positivos	%Muestras	Positivos	% Muestras	Positivos	% Muestras
Agua de Rio	4	16.66%	1	4.16 %	-	-	-	-	-	-	2	12.5%	-	-
Sedimentos de rio	2	6.25%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.25%	1	6.25%
Agua de canal	2	12.5%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.25%	-	-
Sedimento de canal	1	6.66%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.66%	1	6.66%
TOTAL	9	11.26%	1	1.38%	-	-	-	-	-	-	2	9.85%	2	2.81%

Elaborado por (Autor, 2020)

Tabla 5. Identificación de los aislamientos por prueba de Maldi-Tof

MALDI-TOF

Cepa	Origen	Género	Valor Z
128	Sedimento de rio Carrizal, sector Tosagua, Manabí	<i>Enterobacter asburiae</i>	2.31
144	Rio Cutuchi, Latacunga	<i>E. coli</i>	2.3
20	Rio Cutuchi. Latacunga sector IESS	<i>E. coli</i>	2.2
30	Canal Ambato-Huachi-Pelileo	<i>E. coli</i>	2.3
160	Ramal derivado rio Portoviejo	<i>E.asburiae</i>	2.5
182	Sedimento de Canal Latacunga-Salcedo- Ambato sector Salcedo	<i>E. coli</i>	2.2
177	Rio Ambato puente la Delicia	<i>E.asburiae</i>	2.35
175	Sedimento Canal Ambato-Huachi- Pelileo	<i>E. coli</i>	2.3

Elaborado por: (Autor, 2020)

Fuente: (Centro de investigación Microbiológica- Guayaquil, 2019)

Tabla 6. Descripción de las muestras positivas

N° muestra	Origen	<i>E. coli</i>	Coliformes	Colifagos somáticos
20	Rio Cutuchi	1,0x10 ⁴ (1,96x10 ³)	2,90x10 ⁴ (6,52x10 ²)	1,69x10 ² (6,52x10 ²)
81	Rio Daule	6,74 x10 ³ (6,35x10 ²)	4,94 x10 ⁴ (1,27x10 ³)	8,22x10 ⁴ (6,35x10 ²)
142	Rio Cutuchi Salcedo	5,07x10 ³ (6,52x10 ²)	1,80x10 ⁴ (6,52x10 ²)	1,38x10 ³ (6,52x10 ²)
144	Rio Cutuchi Latacunga	7,61x10 ⁵ (6,52x10 ²)	1,99x10 ⁵ (6,52x10 ²)	1,75x10 ³ (2,02x10 ³)
160	Ramal Rio Portoviejo	4,30x10 ³ (6,73x10 ²)	5,06 x10 ⁴ (1,35x10 ³)	1,83x10 ⁶ (2,03x10 ²)
173	Punto de captación Rio Cutuchi Latacunga	8,15 x10 ⁵ (6,38x10 ²)	2,73 x 10 ⁵ (6,38x10 ²)	1,39x10 ³ (2,02x10 ³)
174	Rio Cutuchi sector Salcedo	1,10x10 ⁴ (1,96x10 ³)	2,90x10 ⁴ (6,52x10 ²)	1,69x10 ² (6,52x10 ²)
175	Sedimento Canal Ambato-Huachi-Pelileo	2,21 x10 ⁴ (6,12x10 ²)	2,38 x10 ⁵ (1,89x10 ³)	4,11x10 ⁴ (6,12x10 ²)
177	Rio Ambato puente la Delicia	2,54 x10 ⁴ (6,30x10 ²)	2,70 x10 ⁵ (1,32x10 ³)	1,34x10 ² (1,26x10 ¹)

Elaborado por (Autor, 2020)
Fuente (Quingaluisa, 2019)

4.2. Discusión

Las bacterias presentes en aguas residuales se utilizan como indicadores de contaminación fecal, el consumo de agua potable y de regadío con dichos contaminantes han causado brotes de enfermedades de origen bacteriano, vírico y parasitario (Tallon et al., 2005). Los indicadores de contaminación fecal son importantes para la identificación de fuentes de contaminación, y permiten la toma de acciones para la protección de la salud de la población (Rios-Tobon et al., 2017).

El uso indiscriminado de antibióticos para prevenir y tratar infecciones ha provocado la presencia de determinantes de resistencia. Un estudio realizado por Acevedo et al., (2015), asegura que existe amplia relación entre los residuos de antibióticos en diferentes ecosistemas y el incremento de bacterias resistentes a ellos presentes en el medio ambiente. Los genes resistentes a antibióticos presentes en las bacterias pueden ser transmitidas a seres humanos a través de los alimentos (hortalizas y frutales), consumo de agua y por ende, integrarse por diferentes mecanismos de transferencia genética, afectando directamente a un ser humano (Calero-Cáceres et al., 2017).

Diversos factores como el intercambio de material genético entre las bacterias es frecuente y flexible, aguas contaminadas en sistemas de riego utilizadas para cultivos y tratamientos antibacterianos en animales enfermos; permiten su fácil diseminación y favorece la fácil selección de microorganismos con resistencia, los cuales pueden evolucionar de acuerdo a las condiciones ambientales (Acevedo et al., 2015). En la presente investigación, los niveles de aislamiento de enterobacterias con un fenotipo de resistencia a cefalosporinas de tercera generación, estas aguas además de contener indicadores de contaminación fecal, poseen determinantes de resistencia, debido a que en las muestras se detectó aislamientos, en los cuales algunas bacterias sobrevivieron a concentraciones subinhibitorias de este antibiótico.

Los indicadores de contaminación fecal de *E. coli* y coliformes totales presentes en las muestras de agua y sedimento analizados, tiene similitud con lo reportado en aguas residuales urbanas (Calero-Cáceres et al., 2014). Por lo tanto, es importante comprender la normativa vigente en la ley de aguas del Ecuador con el fin de implementar pautas y regulaciones de manera más realista para salvaguardar nuestros recursos hídricos.

El origen de una de las muestras positivas fue el río Cutuchi en la provincia de Cotopaxi, contiene $7,61 \times 10^5$ UFC/mL de *E. coli* y $1,99 \times 10^5$ UFC/mL de coliformes totales (Tabla 6). Mero (2018) detectó cantidades significativas bacterianas en la provincia de Cotopaxi, en especial en sector del hospital del IESS y Salache, cuyas concentraciones fueron de $8,15 \times 10^5$ UFC/mL de *E. coli* y de

2,73x10⁵ UFC/mL coliformes totales). Estos aislamientos también presentaron un fenotipo de resistencia a una cefalosporina de tercera generación. Se observa una relación directamente proporcional a las densidades bacterianas, totales y resistentes en función del tamaño de la población en donde fueron captadas las muestras.

El río Portoviejo es muy importante para la provincia del Manabí, ya que su afluente es utilizado para agua potable, cultivos agrícolas y pecuarios, y finalmente es devuelta al río. El indicador bacteriano indica que en el río Portoviejo se encontró 4,30 x10³ UFC/mL de *E. coli* y 5,06 x10⁴ coliformes totales (Tabla 6). No existe estudio realizados en el Ecuador sobre determinantes de resistencia en el Río Portoviejo. Sin embargo Huayamae (2013) en su trabajo de investigación doctoral, el cual consistió en 15 muestreos de 105 sectores diferentes del río Daule, provincia de Guayas, reportó 2,4 x 10⁵ UFC/100 mL. Según la normativa estipulada en la legislación ecuatoriana, se menciona que para aguas que únicamente requieran tratamiento convencional, es un máximo de 600 UFC/100 mL; esto quiere decir que los valores reportados en esta investigación de las aguas analizadas no son aptas para consumo humano y producción agrícola y pecuarias (Ley de Recursos Hídricos, 2009)

El uso indiscriminado de los antibióticos influye en la aparición de bacterias multiresistentes. Las cepas resistentes se hacen predominantes por la presión selectiva de los antibióticos que producen la eliminación inmediata de bacterias sensibles. No solo están implicados los antibióticos utilizados en medicina, sino también los de agricultura y veterinaria (Pérez, 2008). La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda la planificación y ejecución de programas de vigilancia que monitoreen la diseminación, prevalencia y evolución de estos mecanismos.

En la tabla 3 se resume los patrones de resistencia genotípica para los aislamientos que presentaron un genotipo de resistencia a un antibiótico emergente. La presencia de estos aislamientos se presume es de origen humano, considerando la elevada carga antropogénica existente en las zonas aledañas. Sin embargo, es necesaria la continuación de estudios relacionados que tengan como objetivo la caracterización

genómica molecular enfocada en la búsqueda de las relaciones filogenéticas con organismos multirresistentes de origen clínico en el Ecuador y en otras partes del mundo (Tuo et al. 2018, Caltagirone et al. 2017, Ovejero et al. 2017).

Con respecto a los aislamientos con genotipo de resistencia móvil a colistina (*mcr-1*): El aislamiento 175 (proveniente del Canal de riego Ambato-Huachi- Pelileo) y 177 (proveniente del Río Ambato) presentaron un genotipo de resistencia a betalactamasas de tipo *bla*_{TEM}; mientras que en la región litoral, el aislamiento 128 presentó un genotipo de resistencia a betalactamasas *bla*_{KPC}. Estos aislamientos altamente evolucionados, presentes en el medio ambiente representan un potencial peligro para la salud pública. A nivel mundial, se asocia de forma común la presencia de una elevada diversidad de genes de resistencia en los aislamientos positivos a colistina móvil (Tuo et al. 2018, Wu et al. 2018, Mendes Oliveira et al. 2019, Webb et al. 2016). Motivo por el cual, su presencia y diseminación por medio de cuerpos de agua representa un peligro latente.

Al existir escasa información sobre contaminación microbiológica de ríos, afluentes, y canales de riego, es necesaria la realización de investigaciones complementarias, las cuales permitan identificar las fuentes de contaminación fecal en estas aguas, las mismas que permitirían diseñar una hoja de ruta con el fin de evitar la diseminación y propagación de clones resistentes.

CAPÍTULO V

5.1. Conclusiones

- Se detectó la presencia de 5 aislamientos de *E. coli*, y 3 de *Enterobacter asburiae*. portadores del gen *mcr-1*, (mobile colistín resistance); así como del gen de resistencia a betalactamasas *bla*_{TEM} en 2 aislamientos de *E. coli* y un aislamiento para el gen de resistencia a *bla*_{KPC}.
- Los aislamientos analizados portadores de genes de resistencia a antibióticos emergentes poseen un patrón de multirresistencias a betalactámicos en de 3 de 6 genes evaluados.
- Los niveles de contaminación del río Cutuchi del canal Latacunga-Salcedo-Ambato y del canal de riego Ambato Huachi Pelileo revelan densidades bacterianas elevadas, siendo similares a las de aguas residuales urbanas.
- En la región Costa, se detectó en la provincia de Manabí (río Portoviejo) un aislamiento portador del gen de resistencia *mcr-1*; mientras que en el Río Carrizal, se detectó un positivo para el gen *bla*_{KPC}.

5.2. Recomendaciones

- Realizar un estudio de factibilidad para la implementación de una planta de tratamiento de aguas contaminadas previo al ingreso al canal de riego Latacunga-Salcedo-Ambato.
- Elaborar una ley a nivel nacional en la que regule el uso de antibióticos como ceftriaxona que es utilizado de forma permanente e indiscriminada en la actividad agropecuaria para controlar la presencia de *E. coli*, acción que

ha creado la actividad de multiresistencia a dicho antibiótico por parte de la bacteria.

- Implementar plantas de tratamiento de aguas residuales, mayor control de las descargas de efluentes por parte de las autoridades y nuevas alternativas para la disminución de los índices de contaminación fecal presentes en los ríos del Ecuador.
- Considerando la constante presencia de *E. coli* a nivel global, se recomienda realizar estudios relacionados a futuro, ya que se ha observado que los mecanismos de resistencia se diseminan y evolucionan de manera espacio-temporal (One Health Ministerial Conference, 2016).

BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo R., Severiche C., Jaimes J. (2015). Bacterias resistentes a antibióticos en ecosistemas acuáticos. *Producción mas Limpia*. Vol.10, No2. 162 págs.
- Aguayo A., Mella S., Riedel G., Bello H., Domínguez M., González-Rocha G. (2016) Colistina en la era post-antibiótica. *Rev. Chil Infectol*; 33(2):166-76 págs.
- Borowiak M., Fischer J., Hammerl J.A., Hendriksen R.S., Szabo I., Malorny B. (2017). Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 3317–3324 págs. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx327>
- Calero-Cáceres W. (2016). Evaluación de reservorios ambientales de partículas fágicas portadoras de genes de resistencia a antibióticos. University of Barcelona.
- Calero-Cáceres, W., Méndez, J., Martín-Díaz, J., & Muniesa, M. (2017). The occurrence of antibiotic resistance genes in a Mediterranean river and their persistence in the riverbed sediment. *Environmental Pollution*, 223, 384–394. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.035>
- Calles J. (2012). La contaminación del agua en Ecuador. Recuperado de <http://www.agua-ecuador.blogspot.com/2012/04/la-contaminacion-del-agua-en-ecuador.html>
- Catry B., Cavaleri M., Baptiste K., Grave K., Grein K., Holm A. & Magiorakos A. P. (2015). Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): Development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *International journal of antimicrobial agents*, 46(3), 297-306 págs.

- Delgado-Blas J. F., Ovejero C. M., Abadia-Patiño L. & Gonzalez-Zorn, B. (2016). Coexistence of *mcr-1* and *bla*NDM in *Escherichia coli* from Venezuela. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(10), 6356-6358 págs.
- European Medicines Agency EMA. (2013). Publishes 2013 annual report, Retrieved of: <https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-publishes-2013-annual-report>
- Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia UNICEF. (2018). Acceso de las personas al recurso agua. Recuperado de: <https://www.unicef.es/noticia/dia-mundial-del-agua-1000-ninos-mueren-cada-dia-por-falta-de-agua-potable>
- Food and Agriculture Organization FAO. (1993). Sustainable control of soil and water. Food and Agriculture Organization. Retrieved from: www.fao.org/land-water/home/es/
- Food and Agriculture Organization FAO. (2017). Conservación de suelos y aguas en América Latina y el Caribe. Food and Agriculture Organization. Retrieved from: <http://www.fao.org/americas/prioridades/suelo-agua/es/>
- Food and Agriculture Organization FAO. (2019). Importance of cleaning water around the world. Food and Agriculture Organization. Retrieved from <http://www.fao.org/3/W1309S/w1309s06.htm>
- Garcia F. (2001). Resistencia antimicobiana a antibioticos más usados en la industria y agricultura. *Revista Medica Costarricense*. 43(3), 101 págs.
- Gil M., Soto A. Usma, J., y Gutiérrez O. (2012). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción más Limpia*. Vol.7, No.2. pág 22.
- Huayamave J. (2013). Estudio de las aguas y sedimentos del río Daule, en la

provincia del guayas, desde el punto de vista físico químico, orgánico, bacteriológico y toxicológico. Tesis Doctoral. Universidad de las palmas de Gran Canaria. Departamento de Ingeniería en procesos. 124 págs.

Lekunberri I., Balcázar J.L., & Borrego C.M. (2018). Metagenomic exploration reveals a marked change in the river resistome and mobilome after treated wastewater discharges. *Environmental Pollution*, 234, 538–542. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.001>

Ley de Recursos Hídricos Usos y Aprovechamiento del Agua publicado en Registro Oficial. (2014). República del Ecuador.

Liu Y.Y., Wang Y., Walsh TR LX., Zhang R., Spencer J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*; 16(2):161-8.

McLellan, S. L., & Eren, A. M. (2014). Discovering new indicators of fecal pollution. *Trends in microbiology*, 22(12), 697-706.

Medina J., Paciel D., Noceti O. & Rieppi G. (2017). Actualización acerca de colistina (polimixina E): aspectos clínicos y equivalencias. *Rev Méd Urug* 2017; 33(3):195-206 págs.

Mero E. (2018). Presencia de genes de Resistencia a antibióticos emergentes en aislados de *Escherichia coli* procedentes de aguas superficiales y sedimentos del río Cutuchi y canal Latacunga- Salcedo-Ambato. Tesis de pregrado. Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Cevallos- Ecuador. 76 pag.

Minnesota Department of Health. (2017). Foreword to the 2017 Minnesota Statewide Health Assessment. [Minnesotastatewidehealthassessment retrieved:https://www.health.state.mn.us/communities/practice/healthymnpartnership/docs/2017MNStatewideHealthAssessment.pdf](https://www.health.state.mn.us/communities/practice/healthymnpartnership/docs/2017MNStatewideHealthAssessment.pdf)

Organización Mundial de la salud. (2010). OMS. Distribución, disponibilidad

de agua para consumo humano. World Health Organization. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>

Organización Panamericana de la Salud. (2016) Alerta epidemiológica: enterobacterias con resistencia transferible a colistina, implicaciones para la salud pública en las Américas 10 de junio 2016. Washindton, DC: OPS. Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2016/06/Enterobacterias-con-resistencia-transferible-a-colistina.pdf>.

Ortega-Paredes D., & Zurita J. (2016). Colistin-resistant *Escherichia coli* clinical isolate harbouring the mcr-1 gene in Ecuador. Epidemiol. ©Cambridge University Press. Infect. 144, 2967–2970. doi:10.1017/S0950268816001369

Owa F.D. (2013). Water Pollution: Sources, Effects, Control and Management. Mediterranean Journal of Social Sciences MCSER Publishing, Rome-Italy. Vol 4, 8. Pag 68.

Pérez D. (2008) Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud Vol. 22 N°3. Pags 11.

Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 70(1), 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>

Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. (2013). Proposed medium-term strategy for the period 2014–2017. Nairobi Declaration on the Role and Mandate of the United Nations Environment Programme, Governing Council decision 19/1, annex, para. 2.

Queenan K., Hasler B., & Rushton J. (2016). A one health approach to antimicrobial resistance surveillance is there a Business case. International antimicrobial agents, 48(4), 427 pags.

<https://doi.org/10.1016/j.ijantimieag.2016.06.014>.

Quingaluisa R. (2019). Cuantificación de indicadores de contaminación fecal en ríos y canales de agua de riego de cinco provincias del Ecuador. Tesis de pregrado. Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Alimentos. Ambato-Ecuador. 98 pág.

Rebelo A.R., Bortolaia V., Kjeldgaard J.S., Pedersen S.K., Leekitcharoenphon P., Hansen I.M., Guerra B., Malorny B., Borowiak M., Hammerl J.A., Battisti A., Franco A., Alba P., Perrin-Guyomard A., Granier S.A., de Frutos C., Escobar Malhotra-Kumar S., Villa L., Carattoli A., Hendriksen R.S. (2018). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Eurosurveillance* 23, 1–11. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672>.

Ríos-Tobón S., Agudelo-Cadavid R., & Gutiérrez-Builes L. (2017). Pathogens and microbiological indicators of the quality of water for human consumption. *Facultad Nacional de Salud Pública*; 35(2):236-247. DOI: 10.17533/udea.rfnsp.v35n2a08.

Secretaría Nacional del Agua SENAGUA. (2010). Reglamento y saneamiento de aguas residuales en el Ecuador. Recuperado de: <https://www.agua.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2016/07/REVISTA-SENAGUA.compressed.pdf>

Tallon P., Magajna B., Lofranco C. & Leung K. (2005). Microbial indicators of faecal contamination in water: a current perspective. Department of Biology, Lakehead University, 955 Oliver Road, Thunder Bay. Ontario – Canada. 28 Pags

Ugarte R., Olivo J., Corso A., Pasteran F., Albornoz E. & Sahuanay Z. (2018). Resistencia a colistina mediado por el gen *mcr-1* identificado en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Primeros reportes en

el Perú. Instituto Nacional de Salud del Niño. Lima, Perú. An Fac med. 2018;79(3):213-7.

Voloshenk A., Gasser G., Cohen K., Gun J. (2015). Emerging pollutants in the Esmeraldas watershed in Ecuador: Discharge and attenuation of emerging organic pollutants along the San Pedro-Guayllabamba-Esmeraldas Rivers. Environmental Science: Processes and Impacts. 35 pags. DOI: 10.1039/C4EM00394B

World Health Organization WHO. (2015). Global action plan on antimicrobial resistance. World Health Organization. Retrieved from http://www.who.int/drugresistance/global_action_plan/en/

World Health Organization WHO. (2019). Millennium development goals. World Health Organization. Retrieved from https://www.who.int/topics/millennium_development_goals/about/en/

Wright G. D. (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. Nat.Rev.Microbiol., 5(1740–1534 (Electronic)), 175–186. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1614>.

ANEXOS

7.1. Ciclos de reacción de PCR para los diferentes genes de resistencia ARGs en el termociclador.

PCR	CICLOS	REACCIÓN
<i>mcr-1</i> <i>mcr-2</i> <i>mcr-3</i> <i>mcr-4</i> <i>mcr-5</i> <i>bla_{KPC}</i> <i>bla_{IMP}</i> <i>bla_{VIM}</i> <i>bla_{NDM}</i> <i>bla_{OXA-48}</i>	35 ciclos	
<i>tetA</i>	35 ciclos	
<i>bla_{TEM}</i>	35 ciclos	
<i>bla_{CTX-M}</i>	35 ciclos	

7.2. Recolección y procesamiento de muestras



2.2.Siembra de las bacterias en medio de cultivo Chromocult® y MacConkey para la reactivación de las bacterias criopreservadas



2.3.Extracción de ADN bacteriano a partir del banco de muestras 2.4. Proceso de PCR y Electroforesis

