



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

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

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

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

Trabajo de Titulación, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingenieras Biotecnólogas, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

AUTORES: Gabriela Estefanía Jerez Lluglla

Nataly Gabriela Lagla Tipán

TUTOR: PhD. William Ricardo Calero Cáceres

Ambato – Ecuador

Septiembre – 2023

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. William Ricardo Calero Cáceres

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la modalidad de 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, 24 de Julio del 2023

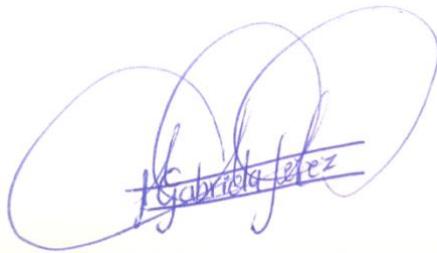
PhD. William Ricardo Calero Cáceres

C.I. 1714344885-9

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotros, Gabriela Estefanía Jerez Lluglla y Nataly Gabriela Lagla Tipán, manifestamos que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingenieras Biotecnólogas, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Gabriela Estefanía Jerez Lluglla

C.I. 1805370432

Autor



Nataly Gabriela Lagla Tipán

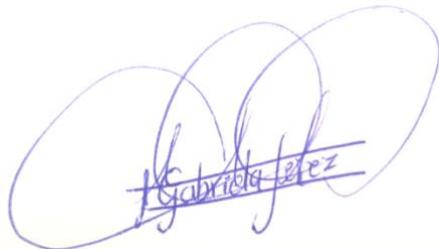
C.I. 0550538003

Autor

DERECHOS DE AUTOR

Autorizamos a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este 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 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.



Gabriela Estefania Jerez Lluglla

C.I. 1805370432

Autor



Nataly Gabriela Lagla Tipán

C.I. 0550538003

Autor

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad 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

C.I. 180357158-5

Mg. Cristian Fernando Galarza Galarza

C.I. 1803160272

Ambato, 25 de Agosto de 2023

DEDICATORIA

A mis padres, Efrain y Marlene, ejemplo de esfuerzo y humildad. Gracias por su entrega total, incondicional y desinteresada.

A mi hermano, Paul, gracias por estar siempre a mi lado y hacer de mí una mejor persona con tu paciencia y calidez.

Gabriela Jerez

A Dios, a la virgen María, por protegerme y ser mi fortaleza en momentos de debilidad.

A mis padres, Carlos y Martha, quienes han sido el pilar fundamental en mi vida, por todo el esfuerzo y sacrificio que han realizado para hacer realidad mis sueños.

A mis hermanos, Jessy, Cris y Darwin, que siempre estuvieron pendientes de mí, brindándome palabras de aliento y cariño para seguir adelante.

Carpe Diem -Vive el momento.

Gabriela Lagla

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradezco a Dios a quien puse en sus manos las riendas de mi camino, por darme vida, salud y fortaleza durante este trayecto.

Agradezco a mis padres, que con su bendición pude terminar con éxito este trabajo; gracias por tomar mi mano en momentos difíciles y por cimentar en mí valores y principios que llevo grabados en mi corazón.

A mi hermano, que me brindó su cariño y motivación para seguir adelante.

A mi amiga y compañera, Gaby L., quien con su apoyo, dedicación y colaboración culminamos satisfactoriamente la ejecución de esta investigación.

A mi tutor de tesis, el PhD. William Calero quien ha sido mi guía y apoyo en el desarrollo de este trabajo. Estoy infinitamente agradecida por darme la oportunidad de participar de forma activa en su equipo de trabajo.

A mis amigos y tesistas: Kathy, Pauli, Leo, Joha y Nico, gracias por las experiencias compartidas, las risas y su sincera preocupación hacia mi persona. A los nuevos tesistas del Dr. William: Keyla, Vivi, Andre, Bryan, Mica, Any y Naty.

Para último, a mis amigas. Tefy, te agradezco por ser mi apoyo emocional, que me impulsa a crecer como persona. Flor, agradezco sinceramente tu escucha y compañía en los momentos de felicidad y en las adversidades.

Gabriela Estefania Jerez Lluglla

AGRADECIMIENTO

Primeramente, agradezco a Dios, a la virgen María y a San Juan Bautista por brindarme salud y vida para cumplir mis metas y permitirme ser mejor persona día con día.

A mis padres, gracias por su esfuerzo, dedicación y amor, por brindarme su sabiduría y consejos y, sobre todo, gracias por educarme como una mujer de bien y darme la mejor herencia que es la educación. Les viviré eternamente agradecida.

A mis hermanos, que siempre estuvieron junto a mí, compartiendo momentos de tristeza y alegría, gracias por ser mi ejemplo a seguir. Los quiero mucho.

A mi cuñado y cuñada, William y Pauli, gracias por su apoyo, por ser personas maravillosas con quien puedo contar incondicionalmente.

A mis sobrinos, Dome, Danna, Sofi y Leo, gracias por ser mi forma de escape, y llenarme de alegría con sus abrazos y ocurrencias, son el mejor regalo que me dio la vida.

Al amor de mi vida, gracias por siempre recordarme los motivos por los cuales inicié mi carrera, gracias por ser mi mejor amigo y cómplice, con quien siempre pude contar, gracias por ayudarme a creer en mí y motivarme día tras día.

A mi tutor de tesis, PhD. William Calero por depositar su confianza en mí y ser eje fundamental durante el proceso, gracias por la paciencia y sabiduría.

A mi amiga y compañera Gaby J., gracias por el tiempo, la paciencia y esfuerzo durante toda la ejecución de esta investigación

A mis amigos y tesistas de laboratorio, Ana, Jenny, Liss, Pato, Rosita, Pauli, Katy, Keyla, Vivi, Andre, Any, Mica, y Nathy, gracias por todas las risas.

A mis amigos, Joha, Luis, Nico, Vivi y Alexis, gracias por los momentos vividos a lo largo de la vida universitaria.

Nataly Gabriela Lagla Tipán

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	iii
DERECHOS DE AUTOR	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
AGRADECIMIENTO	viii
RESUMEN EJECUTIVO	xiii
CAPÍTULO I	1
MARCO TEÓRICO	1
1.1 Antecedentes investigativos	1
1.1.1 Justificación	1
1.1.2 Resistencia a los antimicrobianos	3
1.1.3 Mecanismos de resistencia antimicrobiana	4
1.1.4 Antibióticos de importancia crítica	6
1.1.5 Enfoque <i>One Health</i>	7
1.1.6 Diseminación de la RAM.....	9
1.1.7 Contaminación de aguas en Ecuador	9
1.2 Objetivos	12
1.2.1. Objetivo general	12
1.2.2. Objetivos específicos	12
1.3 Hipótesis	13
1.3.1. Hipótesis nula.....	13
1.3.2. Hipótesis alternativa.....	13
CAPÍTULO II	14
METODOLOGÍA	14

2.1. Materiales	14
2.2. Métodos	18
2.2.1. Selección de los aislamientos de <i>E. coli</i>	18
2.2.2. Generación de Biomasa.....	18
2.2.3. Extracción de ADN.....	19
2.2.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Electroforesis	20
2.2.5. Ensayos de conjugación	25
2.2.6. Eficiencia de la conjugación	26
2.2.7. Perfiles de resistencia fenotípicos	26
2.2.8. Perfiles de resistencia Genotípico	30
2.2.9. Tipificación molecular por el Consenso Intergénico Repetitivo de Enterobacterias (ERIC) PCR	33
CAPÍTULO III.....	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
3.1. Identificación de <i>E. coli</i> portadores de genes de resistencia a carbapenémicos, tigeciclina y colistina.....	34
3.2. Ensayos de transconjugación utilizando biomasa proveniente de aislamientos seleccionados y la bacteria receptora <i>E. coli</i> J53.	38
3.3. Evaluación de los perfiles de resistencia a antibióticos de los aislamientos seleccionados y de los transconjugados obtenidos por métodos fenotípicos y genotípicos.....	41
CAPITULO IV	46
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	46
4.1. Conclusiones	46
4.2. Recomendaciones	47
C. MATERIALES DE REFERENCIA	48
Referencias Bibliográficas	48
Anexos	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Equipos de laboratorio	14
Tabla 2. Materiales de laboratorio	15
Tabla 3. Reactivos de laboratorio.....	16
Tabla 4. Insumos y materiales de escritorio.....	17
Tabla 5. Secuencias de los primers empleados en la identificación molecular de β -lactamasas, carbapenemasas, tigeciclina y colistina.	23
Tabla 6. Modelo de placa de microdilución con 4 concentraciones para 8 muestras	28
Tabla 7. Punto de Corte CIM para colistina en <i>E.coli</i>	29
Tabla 8. Secuencias de primers adicionales empleados en la PCR.....	31
Tabla 9. Frecuencia de genes de resistencia a antibióticos identificados.	35
Tabla 10. Eficiencia de conjugación	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Conjugación Bacteriana.....	5
Figura 2. Rutas de diseminación de la RAM entre animales, personas y el medio ambiente.	8
Figura 3. Protocolo de purificación de <i>E. coli</i>	19
Figura 5. Extracción de ADN por el método de shock térmico.	20
Figura 6. Protocolo de PCR y Electroforesis en gel de Agarosa.	22
Figura 7. Protocolo de proceso de conjugación.	26
Figura 8. Protocolo de evaluación de perfiles de resistencia fenotípicos.	27
Figura 9. Protocolo de microdilución en caldo.	29
Figura 10. Dendograma por análisis de ERIC-PCR y datos de los perfiles de resistencia fenotípico y genotípico.....	44

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Codificación de los aislamientos y los resultados de las pruebas de identificación de <i>E.coli</i>	62
Anexo 2. Gel de electroforesis con muestras positivas para el gen <i>bla</i> _{OXA-48}	72
Anexo 3. Gel de electroforesis con muestras positivas para el gen <i>bla</i> _{SHV}	72
Anexo 4. Gel de electroforesis con muestras positivas para el gen <i>mcr-1</i>	73
Anexo 5. Aislamientos positivos para los genes de resistencia a colistina, β -lactámicos y carbapenémicos.	73
Anexo 6. Perfil de resistencia de los aislamientos ambientales en relación con el gen identificado.....	74
Anexo 7. Perfil de resistencia de los aislamientos conjugados en relación con el gen identificado.....	75

RESUMEN EJECUTIVO

El río Cutuchi, fuente del canal de riego Latacunga-Salcedo-Ambato, presenta una notable contaminación por bacterias resistentes a antibióticos procedentes de descargas de agua residual. Este estudio analizó aislamientos de *E. coli* recogidos de abril 2022 a marzo 2023 en ambos cuerpos de agua, enfocándose en la presencia de genes de resistencia a antibióticos de último recurso (carbapenémicos, tigeciclina, colistina) transmitidos por plásmidos (LARGs).

Bajo la línea de investigación de Microbiología y Biotecnología, se evaluó la presencia de LARGs en aislamientos de *E. coli* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y electroforesis. Con los aislamientos positivos, se realizaron ensayos de conjugación utilizando la cepa *E. coli* J53 como receptora. Los perfiles de resistencia fenotípica se realizaron por el método de Kirby-Bauer, y por microdilución en caldo; y el perfil genotípico se evaluó mediante PCR convencional, ERIC-PCR y electroforesis.

Se detectaron tres aislamientos con genes de resistencia móvil a colistina *mcr-1*, dos portadores de betalactamasa que hidroliza carbapenémicos SHV, y un portador de carbapenemasa OXA-48, el cual representa el primer aislamiento ambiental reportado en Ecuador. La transconjugación determinó la transmisibilidad de estos genes por transferencia genética horizontal. El análisis fenotípico reveló que los aislamientos portadores de los genes evaluados son extremadamente drogo-resistentes (XDR). Por otro lado, el análisis genotípico determinó que la mayoría de los genes estudiados son transmisibles por conjugación y están asociados con otros genes de resistencia a antibióticos.

Palabras clave: RAM, transconjugación, gen *mcr-1*, OXA-48, gestión ambiental.

ABSTRACT

The Cutuchi River and the Latacunga-Salcedo-Ambato irrigation channel exhibits significant contamination by antibiotic-resistant bacteria from wastewater discharges. This study analyzed *E. coli* isolates collected from April 2022 to March 2023 in both water bodies, focusing on the presence of last resort antibiotic resistance genes (carbapenems, tigecycline, colistin) transmitted by plasmids (LARGs).

Under the research line of Microbiology and Biotechnology, the presence of LARGs in *E. coli* isolates was evaluated using conventional Polymerase Chain Reaction (PCR) and gel electrophoresis. Transconjugation tests were performed using the *E. coli* J53 as recipient strain. Phenotypic resistance profiles were determined by the Kirby-Bauer method and broth microdilution, and the genotypic profile was evaluated using conventional PCR, ERIC-PCR, and gel electrophoresis.

Three isolates with *mcr-1* colistin mobile resistance genes were detected, two carriers of carbapenem-hydrolyzing betalactamase SHV, and one carrier of carbapenemase OXA-48, which represents the first environmental isolation reported in Ecuador. Transconjugation determined the transmissibility of these genes by horizontal gene transfer (HGT). Phenotypic analysis revealed that the isolates carrying the evaluated genes are extremely drug-resistant (XDR). In addition, genotypic analysis determined that most of the studied genes are transferable by transconjugation and are associated with other antibiotic resistance genes.

Key words: AMR, transconjugation, *mcr-1* gene, OXA-48, environment management.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

1.1.1 Justificación

La Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró a la resistencia a los antimicrobianos (RAM) como una de las diez principales amenazas de salud pública. Principalmente, porque los mecanismos de resistencia de ciertas bacterias patógenas han ido evolucionando y desarrollando resistencia frente a tratamientos emergentes y tradicionales, lo cual compromete la capacidad de tratar enfermedades en las que se requiere el uso de antibióticos (OMS, 2021). Actualmente, estos microorganismos han incrementado la tasa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, produciéndose cerca de 4.5 millones de muertes anuales hasta el 2019. De acuerdo con proyecciones con respecto a la RAM bacteriana, indican que para el año 2050 la cifra puede alcanzar los 10 millones de personas, ocasionando una pérdida estimada de \$100 billones de dólares (Murray et al., 2022).

Considerando esta emergencia, la OMS publicó un listado de patógenos prioritarios resistentes a antibióticos en el que *Escherichia coli* (enterobacteria) ubicada en la categoría 1 de importancia crítica de vigilancia epidemiológica, resistentes a carbapenémicos (CRE) productores de betalactamasas de espectro extendido (ESBL) (Organización Mundial de la Salud, 2021). El aumento en la proporción de infecciones agudas asociadas con estas cepas es una preocupación clínica por la evolución puntual de las enzimas ESBL en genes *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}* y *bla_{SHV}*. Dada la presencia de genes que codifican la síntesis de carbapenemasas

*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA-48} (Hooban et al., 2020) que complican el uso de antibióticos carbapenémicos y betalactámicos.

Los CRE son tratados con antibióticos de último recurso o “grupo de reserva” como lo son la tigeciclina y la polimixina B. No obstante, la eficacia de estos antibióticos se ha visto comprometida significativamente por la aparición y diseminación de genes de resistencia móvil a colistina (*mcr-1*) (Aslam et al., 2018) y por la familia de genes de resistencia móvil a tigeciclina (*tet(X)*) (Zhou et al., 2020). Cabe mencionar que estos genes de resistencia a los antibióticos de último recurso (LARGs) se localizan habitualmente en plásmidos, los cuales portan genotipos adicionales de resistencia antimicrobiana (Zhu et al., 2022). Por lo tanto, es importante subrayar el papel de los plásmidos como el principal elemento genético móvil implicado en la transferencia horizontal de genes (HGT, por sus siglas en inglés) (Kohyama & Suzuki, 2019). Un proceso que facilita la transmisión y diseminación de estos genes de resistencia (Jiang., 2020).

Los ecosistemas acuáticos desempeñan un papel fundamental en la comprensión de la propagación y desarrollo de la RAM a nivel global (Calero-Cáceres, Marti, ., 2022). Estos ambientes actúan como puntos finales para los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) y la liberación directa de aguas residuales de origen humano o animal, lo que los convierte en un importante foco de interés para la investigación (Olivares-Pacheco., 2023). Los cuerpos de agua impactados por la actividad antropogénica se consideran fuentes de aparición, evolución y diseminación de bacterias resistentes a antibióticos (ARB por sus siglas en inglés) y LARGs (Hooban et al., 2020). Los que pueden desempeñar un rol crítico en la emergencia mundial de la resistencia antimicrobiana (Delgado-Blas et al., 2021).

En el caso de Ecuador, existe una considerable falta de cobertura de tratamiento de aguas residuales, lo cual ha impactado negativamente en el medio ambiente (WHO, 2019). Debido a que, estas aguas son desechadas directamente en los sistemas de agua dulce más cercano (Vinueza et al., 2021). El río Cutuchi,

principal afluente del canal del riego Latacunga-Salcedo-Ambato ubicado en la sierra Centro, recibe un estimado de 30.000 m³ de agua residual/día (**GAD Latacunga, 2014**). De acuerdo con investigaciones preliminares, este río presenta elevados niveles de contaminación biológica con bacterias multirresistentes (**Calero-Cáceres et al., 2022**). Por lo tanto, este río constituye un elemento de diseminación de ARBs y genes de resistencia a antibióticos (ARGs, por sus siglas en inglés) ocasionando serios riesgos para la salud pública.

Motivo por el cual, el objetivo de la presente es evaluar la diseminación de *E. coli* portadora de LARGs en aislados obtenidos entre abril 2022 hasta marzo 2023 de muestras del río Cutuchi y del canal Latacunga-Salcedo-Ambato, con el fin de proporcionar información sobre la diseminación de bacterias resistentes a los antibióticos emergentes en entornos acuáticos de Ecuador.

1.1.2 Resistencia a los antimicrobianos

La resistencia a los antimicrobianos es considerada una pandemia silenciosa que causa millones de muertes anualmente (**Murray et al., 2022**). A la presente, se ha identificado nuevas formas de resistencia que se extienden rápidamente entre continentes, denotando el nivel de evolución y diseminación acelerada que este fenómeno presenta, siendo prioridad la vigilancia sistémica mundial de la RAM (**Centers for Disease Control and Prevention, 2019**).

En este contexto, la OMS y el grupo interagencial de la Organización de las Naciones Unidas (ONU), mediante el plan de acción mundial sobre la RAM (GAP-AMR) trabajan conjuntamente para la búsqueda de nuevas soluciones ante este fenómeno a través de un enfoque *One Health* (**Murray et al., 2022**). El cual aborda el problema a nivel local, regional, nacional y mundial, con el objetivo de lograr los mejores resultados en salud considerando la interrelación entre personas, animales, plantas y su entorno (**World Health Organization, 2019**).

Sin embargo, a pesar de la colaboración mundial, en el Ecuador existe una gran cantidad de deficiencias con respecto al seguimiento epidemiológico de RAM, con respecto a los orígenes, reservorios y vías de diseminación (**Calero-Cáceres & Balcázar, 2023**). Un reporte de la organización *One Health Trust* indica que en el país se presenta un elevado porcentaje de resistencia a antibióticos prioritarios: 51.34% perteneciente a aislados de enterobacterias ESBL, y 32.67% de *Klebsiella pneumoniae* presenta resistencia a carbapenémicos en humanos (**Aditi et al., 2021**). Además, el país no forma parte del Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia y el Uso de Antimicrobianos (GLASS), mismo que ayuda a evaluar, informar y monitorear el impacto de la RAM (**World Health Organization, 2022**).

La aparición de la RAM es un proceso natural, pero varios factores pueden favorecer la evolución de sus mecanismos; entre los principales factores que influyen este fenómeno está el uso excesivo de antibióticos en animales y humanos, la liberación de antibióticos no metabolizados o sus residuos en el medio ambiente a través de aguas residuales y excretas (**Aslam et al., 2018**). Es por esta razón que para establecer estrategias de mitigación de la RAM, se debe conocer la capacidad evolutiva de los microorganismos, ya sea, por procesos de mutación o adquisición de genes de resistencia por transferencia genética horizontal (HGT) (**Aljeldah, 2022; Jasovský et al., 2016**).

1.1.3 Mecanismos de resistencia antimicrobiana

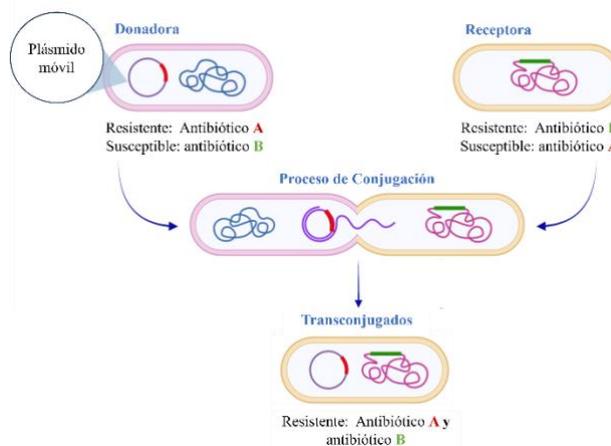
Las bacterias presentan dos tipos de mecanismos de resistencia a los antibióticos, la resistencia intrínseca y la resistencia adquirida (**Soni et al. 2022**). La resistencia intrínseca como una característica estructural o funcional inherente de algunas especies bacterianas proporciona resistencia a ciertos antibióticos. Tal es el caso de *Mycoplasma* spp., en el cual, la falta de una pared celular le confiere resistencia intrínseca frente a los antibióticos β -lactámicos (**Abushaheen et al., 2020**).

La resistencia adquirida o extrínseca se desarrolla debido a la presión selectiva que los antibióticos imponen sobre los microorganismos (Arzanlou et al., 2017). Esta presión promueve instancias de mutación, que conducen a la evolución de varios mecanismos de resistencia (Soni et al., 2022). Alternativamente, este tipo de resistencia también puede originarse a partir de la adquisición de ARGs a través de HGT (Berglund, 2015). Estos mecanismos incluyen la expulsión activa del antibiótico, la inhibición de la difusión del antibiótico en la célula (Łapińska et al., 2022), la modificación de los antibióticos mediante hidrólisis (Schaenzer & Wright, 2020) y la alteración del objetivo del antibiótico mediante mutaciones (Breijyeh et al., 2020) o modificaciones postraduccionales (Varela et al., 2021).

Los mecanismos de HGT representan las principales vías de difusión de ARGs entre diferentes células bacterianas y suele estar mediada por mecanismos de conjugación, transformación o transducción (Partridge et al., 2018). La conjugación implica una unión temporal entre dos bacterias, durante la cual se produce la transferencia de material genético, incluyendo ARGs, mediada por plásmidos y elementos genéticos móviles (MGE) desde la bacteria donante hacia la bacteria receptora a través de un puente de conjugación (Pulingam et al., 2022).

Figura 1.

Conjugación Bacteriana



1.1.4 Antibióticos de importancia crítica

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha categorizado ciertos microorganismos como críticos, entre los que se incluyen diversas enterobacterias productoras de carbapenemasas y beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) (**World Health Organization, 2022**). Estas bacterias, como *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*, son especialmente preocupantes debido a su capacidad para resistir a los antibióticos de última línea, como los carbapenémicos, y propagar rápidamente sus mecanismos de resistencia a través de la transferencia horizontal de genes (**Abushaheen et al., 2020**). La amenaza que representan estos patógenos es enorme, pues su resistencia a los tratamientos actuales pone en riesgo la eficacia de los procedimientos médicos esenciales, como la cirugía y la quimioterapia. Esta situación subraya la necesidad urgente de desarrollar nuevos y efectivos antibióticos para contrarrestar la creciente amenaza de la resistencia a los antibióticos (**Castañeda-Barba et al., 2023**).

Frente a la resistencia emergente de enterobacterias productoras de carbapenemasas y beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), la colistina y la tigeciclina se han convertido en valiosos antibióticos terapéuticos de último recurso (**De Oliveira et al., 2020**). La colistina, un polipéptido antimicrobiano, se ha reutilizado para tratar infecciones graves causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes. Sin embargo, la evolución y diseminación de nuevos mecanismos de resistencia a este antibiótico, conocidos como *mcr* (del inglés *mobile colistin resistance*) desde el año 2015, plantea una nueva amenaza a este tratamiento de último recurso (**Alawi et al., 2022**).

Por otro lado, la tigeciclina, un antibiótico de la clase de las gliciliclinas, ha demostrado ser efectivo contra una variedad de bacterias resistentes, incluyendo las enterobacterias productoras de carbapenemasas y BLEE positivas (**Hsieh et al., 2021**). Sin embargo, la reciente evolución y diseminación de genes que confieren resistencia a la tigeciclina *tet(X)*, detectados habitualmente en

plásmidos, subraya la necesidad de continuar con la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos, así como en la detección de reservorios y el análisis de las vías de diseminación de estos microorganismos portadores de genes de resistencia a antibióticos emergentes (**R. Li et al., 2020**).

La resistencia a colistina mediada por plásmidos (*mcr*) representa una amenaza considerable desde el punto de vista sanitario, ya que ha demostrado su capacidad para diseminarse rápidamente en la familia Enterobacteriaceae y los reportes de diseminación mundial son alarmantes. La familia de genes *mcr* codifica la enzima llamada fosfoetanolamina transferasa, que modifica el sitio de acción de la colistina y reduce su efectividad (**Ugarte et al., 2018**). Por otro lado, también se ha detectado la presencia emergente de variantes del gen *tet(X)*, que codifica para tetraciclinas destructasas móviles, capaces de modificar la bomba de eflujo y disminuir la concentración intracelular efectiva de la tigeciclina (**Fang et al., 2020**). Estos hallazgos subrayan la necesidad de una vigilancia continua y un enfoque integral para el desarrollo de nuevos antibióticos que puedan superar la resistencia bacteriana emergente, asegurando así opciones terapéuticas efectivas frente a estas peligrosas infecciones (**Aminov, 2021**).

1.1.5 Enfoque *One Health*

Hace aproximadamente una década, se introdujo el término *One Health* en la literatura científica. Este concepto puede tener diversas interpretaciones, por lo que en el contexto que se abordará a continuación, se define a *One Health* como un enfoque que reconoce la estrecha conexión e interdependencia entre la salud de los seres humanos, los animales domésticos y salvajes, las plantas y el medio ambiente, incluyendo los ecosistemas (**Castañeda-Barba et al., 2023**).

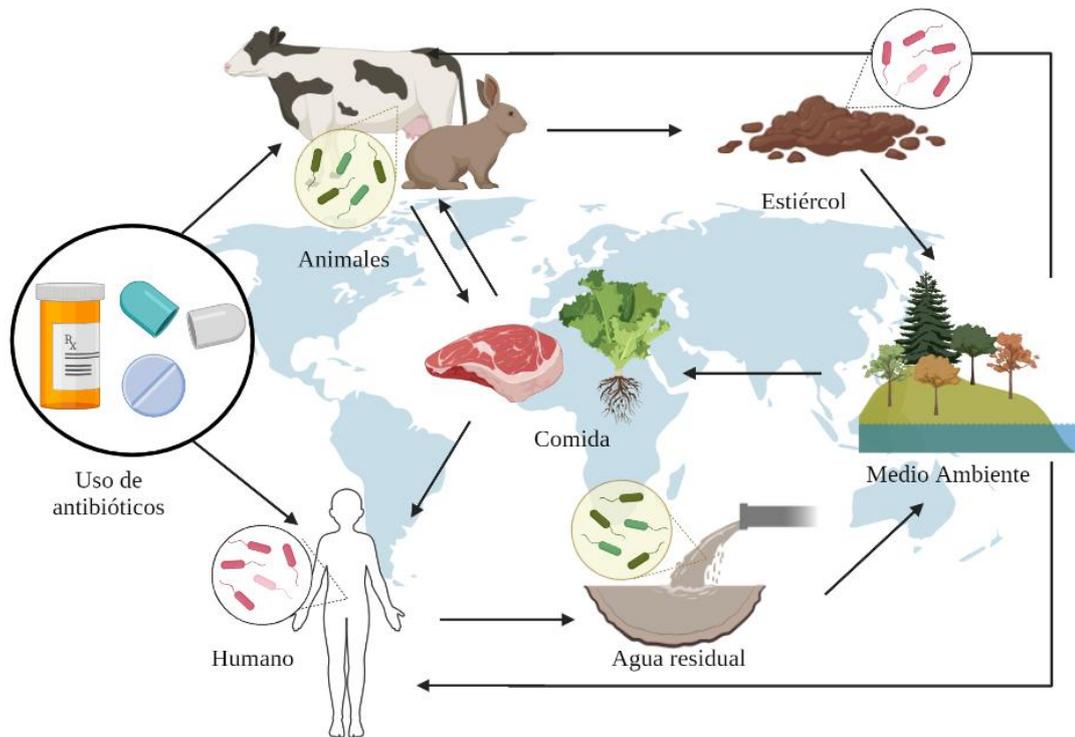
El enfoque *One Health* implica la colaboración entre profesionales de la salud humana, veterinarios, ambientales y otras partes interesadas, reconociendo la

interconexión de la salud humana, animal y ambiental en relación con la resistencia a los antimicrobianos, debido a que muchos de los animales y hábitats ambientales sirven como reservorio de ARGs, mismos que se propagan de forma descontrolada a través de HGT (White & Hughes, 2019). Este busca tomar medidas de prevención, vigilancia, y control de la RAM, mediante el uso responsable de antimicrobianos y la mejora de los sistemas de vigilancia para de esta manera fomentar el bienestar y abordar las amenazas de la salud pública (Alawi et al., 2022).

Este enfoque reconoce que el uso de antibióticos en un sector tiene influencia en otro, dándole importancia a la necesidad de investigación integrada, así como en la creación de políticas públicas (Rhouma et al., 2023). Por lo tanto, el estudio de la RAM es de vital importancia, para determinar el nivel de evolución y diseminación de la RAM, así como la mejora del tratamiento de enfermedades con antibióticos.

Figura 2.

Rutas de diseminación de la RAM entre animales, personas y el medio ambiente.



1.1.6 Diseminación de la RAM

La resistencia a los antimicrobianos tiene consecuencias graves para la salud humana y la economía, y su impacto debe explorarse desde diferentes perspectivas para la guía en la toma de decisiones, teniendo en cuenta el diseño de medidas apropiadas para controlar esta crisis global, brindando la atención, financiación, desarrollo de capacidades, investigación, y el establecimiento de prioridades específicas de patógenos que el problema requiere (**Dadgostar, 2019**).

En particular, las aguas residuales se han identificado como un vehículo de transporte crucial para las bacterias resistentes a antibióticos (ARB) (**Wang et al., 2023**). Cuando las aguas residuales municipales, domésticas, hospitalarias y de camales, se descargan y recolectan a través de sistemas centralizados en plantas de tratamiento, estas se consideran “puntos de convergencia”, que en conjunto con las diversas presiones de selección ejercidas por los compuestos de los desechos de diferentes orígenes crean condiciones favorables para la transferencia de genes de resistencia a antibióticos (ARGs) y proliferación de ARBs (**W. Li & Zhang, 2022**).

Además, la contaminación ambiental derivada de las aguas residuales puede extender la resistencia a los antimicrobianos a ecosistemas acuáticos, suelo y cultivos agrícolas, lo que a su vez aumenta el riesgo de exposición y transmisión de ARBs a través de la cadena alimentaria (**Aljeldah, 2022**).

1.1.7 Contaminación de aguas en Ecuador

Ecuador enfrenta un importante desafío relacionado con la falta de infraestructura adecuada para el tratamiento de aguas residuales en muchas áreas del país. La gestión de residuos líquidos en el país se considera una fuente en riesgo, debido a que solo el 7% de las aguas residuales domésticas e industriales son tratadas antes

de ser vertidas a los ríos, lo que representa una de las mayores fuentes de contaminación ambiental (**Zapata et al., 2021**). En adición, con respecto a las plantas de tratamiento disponibles, de acuerdo con datos proporcionados por la Agencia de Regulación y Control del Agua, se estima que aproximadamente el 74,2% de los GAD Municipales cuentan con una o más plantas de tratamientos para las aguas residuales urbanas, 22,6% no disponen de ninguna planta de tratamiento de aguas residuales y cerca del 3,2% no presentan un sistema de alcantarillado (**INEC, 2021**).

El Río Cutuchi al ser un afluente principal de la zona centro del Ecuador recibe descargas de aguas residuales sin tratar generados por la alta densidad poblacional colindante, además de vertidos de las zonas industriales, actividades agropecuarias y escorrentías (**Zambrano Mero et al., 2022**). En la investigación de **Taco & Ushiña, (2023)**, afirman que entre los principales contaminantes de este río se encuentran organismos bacterianos, fúngicos, virales, parasitarios, además de sustancias químicas. La presencia de contaminación biológica y química en este cuerpo de agua es crítica, dado que el agua proveniente de la cuenca del río Cutuchi es utilizada para abastecer el canal Latacunga-Salcedo-Ambato, el cual es crucial para el riego de más de 24.000 hectáreas de tierras de cultivo (**Zapata et al., 2021**).

En este contexto, el estudio realizado por **Calero-Cáceres et al., (2022)** ha revelado una alta prevalencia de genes de resistencia a antibióticos en *E. coli* en el afluente del río Cutuchi. Cabe mencionar, que todos los aislados estudiados mostraron un fenotipo de resistencia a β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Por lo tanto, el análisis genotípico se vuelve crucial para determinar la producción de estas enzimas y es fundamental para llevar a cabo una vigilancia adecuada de la diseminación de la resistencia a los antimicrobianos (RAM) en dicho afluente.

En definitiva, es evidente la necesidad de invertir de manera urgente en medidas para mejorar la infraestructura, garantizar el acceso a agua de calidad y el monitoreo de diseminación de ARGs en todo el país, puesto que, varios estudios realizados en Ecuador han planteado la preocupante contaminación de fuentes de agua con microorganismos que podrían representar un riesgo para la salud humana. Ante esta situación, es crucial tomar acciones concretas para proteger y preservar la calidad del agua, así como implementar sistemas de tratamiento efectivos que aseguren su potabilidad y seguridad para la población.

1.2 Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Evaluar la presencia de genes de resistencia a carbapenémicos, tigeciclina y colistina mediada por plásmidos en aislados de *E. coli* procedentes del río Cutuchi y del canal Latacunga-Salcedo-Ambato.

1.2.2. Objetivos específicos

- Seleccionar aislamientos de *E. coli* portadores de genes de resistencia a carbapenémicos, tigeciclina y colistina mediada por plásmidos.
- Realizar ensayos de transconjugación utilizando biomasa proveniente de aislamientos seleccionados y la bacteria receptora *E. coli* J53.
- Evaluar los perfiles de resistencia a antibióticos de los aislamientos seleccionados y de los transconjugados obtenidos por métodos fenotípicos y genotípicos

1.3 Hipótesis

1.3.1. Hipótesis nula

Los aislados de *Escherichia coli* procedentes del Río Cutuchi y del canal Latacunga-Salcedo-Ambato no presentan genes de resistencia a carbapenémicos, tigeciclina y colistina mediada por plásmidos

1.3.2. Hipótesis alternativa

Los aislados de *Escherichia coli* procedentes del Río Cutuchi y del canal Latacunga-Salcedo-Ambato presentan genes de resistencia a carbapenémicos, tigeciclina y colistina mediada por plásmidos.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Materiales

Tabla 1.

Equipos de laboratorio

Equipos	Cantidad
Estufa bacteriológica +5°C-120°C	1
Balanza analítica	1
Autoclave	1
Vórtex	1
Mechero Bunsen	1
Microcentrífuga	1
Cabina de flujo laminar Bioseguridad 2	1
Nevera (4°)	1
Congeladora (-20 °C)	1
Ultracongelador (-80 °C)	1
Termociclador	1
Termobloque	1
Fuente de poder	1
Transiluminador	1

Tabla 2.*Materiales de laboratorio*

Materiales	Cantidad
Micropipeta 100 – 1000 μ L	1
Micropipeta de 20 – 200 μ L	1
Micropipeta de 0.5 – 10 μ L	1
Botellas de autoclave de 100 – 500 mL	5
Espátula	1
Tubos de ensayo de 5 mL con tapa	50
Placas mono Petri plásticas	700
Asas de Digralsky	2
Asas de inoculación	3
Tubos para PCR 0.2 mL	1
Pinzas	1
Pipeta x 25 mL	2
Pera de succión	2
Probeta de vidrio 100 mL	1
Caja Petri de cristal	1
Gradilla	2
Hisopos estériles	400
Puntas de 100 – 1000 μ L	50
Puntas de 20 – 200 μ L	50
Puntas con filtro 0.5 – 10 μ L	50
Puntas con filtro de 20 – 200 μ L	50

Materiales	Cantidad
Puntas con filtro de 100 – 1000 µL	50
Viales de criopreservación	50
Fundas ziploc	100

Tabla 3.

Reactivos de laboratorio

Material	Cantidad
Agar MacConkey Merck®	500 g
Agar Mueller Hinton Merck®	300 g
Ceftriaxona	0.125 g
Caldo Luria Bertani Merck®	50 g
Glicerol	1 L
Aceite mineral	0.1 L
Alcohol 96 %	1 L
Agua tipo II	3 L
Agua destilada	10 L
Buffer fosfato salino (PBS)	500 g
Discos de antibióticos	300 unidades
Buffer TBE	3 L
Buffer de carga (Blue Juice)	1 paquete
SYBR® Safe DNA Gel Strain	1 unidad

Tabla 4.*Insumos y materiales de escritorio*

Insumos y Materiales	Cantidad
Cofias	2
Mascarillas KN95	6 cajas x 50 unidades
Guantes	6 cajas x 50 pares
Cinta testigo de esterilización	1 rollo
Cinta adhesiva de papel	2 rollos
Cinta para etiquetar	1 rollo
Rotulador doble punta	3 unidades
Papel aluminio	3 rollos
Papel industrial	2 rollos
Jabón líquido para platos	2
Alcohol antiséptico	3 litro
Gel antibacterial	1 frasco
Jabón líquido	1 frasco
Caja de fósforos	5
Cloro	1 galón
Computadora	2
Hojas de papel bond A4	1 paquete
Impresora	1
Cuaderno cosido	2
Regla	2
Calculadora	1

2.2. Métodos

2.2.1. Selección de los aislamientos de *E. coli*

Las muestras utilizadas en este estudio consistieron en aislamientos de *E. coli* obtenidos durante dos períodos distintos. El primero de ellos abarcó desde abril hasta septiembre de 2022, y correspondió al proyecto de vinculación con la sociedad denominado "Evaluación de la contaminación microbiológica del canal Latacunga – Salcedo – Ambato, Fase I" del cual se colectaron 55 aislamientos. El segundo período abarcó desde octubre de 2022 hasta marzo de 2023, y se relacionó con el proyecto de titulación "Monitoreo de las comunidades microbianas de la cuenca del río Cutuchi utilizando metabarcoding 16S rRNA e indicadores microbianos tradicionales" del cual se recolectaron 148 aislamientos.

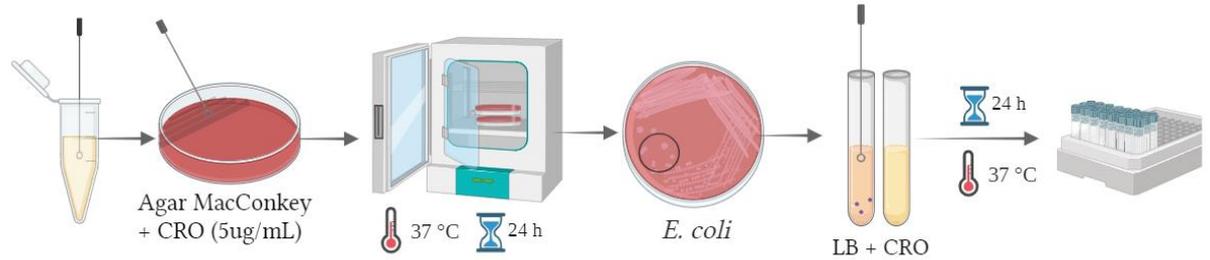
Cabe recalcar que las muestras presentaron resistencia a Ceftriaxona (CRO), la cual es una cefalosporina de tercera generación con acción bactericida, misma que puede ser inhibida por ciertas enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). De forma general, las bacterias portadoras de LARGs albergan fenotipos BLEE (Alawi et al., 2022).

2.2.2. Generación de Biomasa

Las cepas del banco de criopreservación se inocularon mediante estría escocesa en agar MacConkey suplementado con Ceftriaxona, y posteriormente se incubaron a 37°C. Después de 24 horas, se tomó dos colonias del cultivo puro utilizando un asa de cultivo estéril, las cuales se depositaron en tubos de ensayo de tapa rosca que contenían medio de cultivo Luria Bertani (LB) con antibiótico. A continuación, los tubos con el inóculo se incubaron durante 24 horas a 37 °C. El crecimiento de las cepas se evaluó mediante la comparación de la turbidez del medio inoculado con el control negativo (medio LB con Ceftriaxona sin inóculo) (Moore & Barlow, 2019).

Figura 3.

Protocolo de purificación de E. coli.

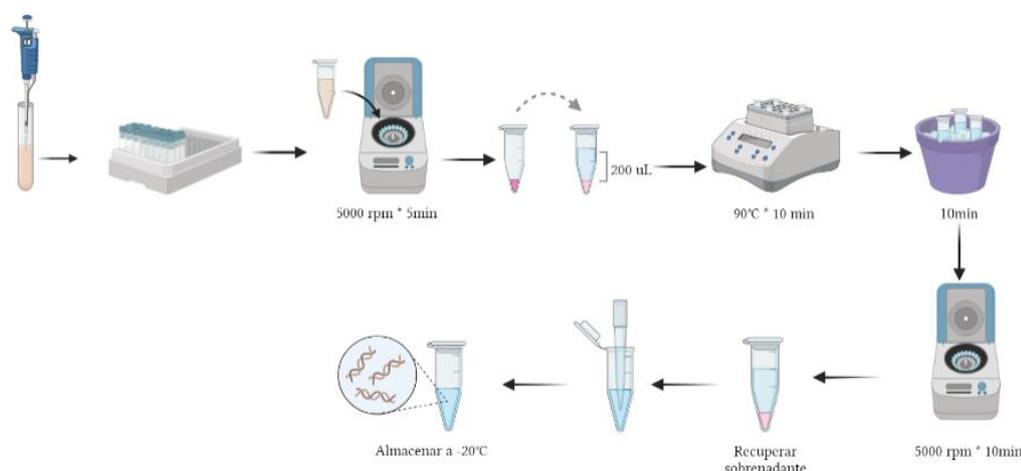


2.2.3. Extracción de ADN

Un volumen de 1 mL de biomasa se dispuso en un tubo de centrifuga estéril y se centrifugó a 5000 rpm por 5 min. El pellet se re-suspendió en 200 μ L de agua tipo II. Para efectuar el método choque térmico descrito por **Sánchez-Salazar et al., (2020)** con algunas modificaciones, se llevó los tubos a una temperatura de 90°C con ayuda del termobloque por 10 minutos, luego se colocaron los tubos en hielo por el mismo tiempo. En última instancia, se centrifugó por 10 min y se transfirió el sobrenadante (ADN de interés) a un tubo de microcentrifuga nuevo para su posterior almacenamiento a -20°C (**Adegoke et al., 2020**).

Figura 4.

Extracción de ADN por el método de shock térmico.



2.2.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Electroforesis

Para identificar los genes que otorgan la resistencia antibiótica a los aislamientos seleccionados se aplicó un ensayo de PCR convencional para generar varias copias de las regiones de interés. Las condiciones de PCR para los genes codificantes de carbapenemasas (*bla_{OXA-48}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*) que se utilizaron fueron: desnaturalización inicial a 94 °C por 10 minutos, 36 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, una etapa de alineamiento con una temperatura descrita en la **Tabla 5** por 40 segundos, seguido de una extensión a 72 °C por 50 segundos y elongación final a 72 °C por 5 minutos (Adegoke et al., 2020).

Adicionalmente, se evaluó la resistencia a colistina con las condiciones de reacción de PCR para el gen *mcr-1* que se componen de: una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min; 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, el detalle de las temperaturas de alineamiento se describe en la **Tabla 5** por 30 segundos, y una extensión final a 72°C por 5 min (Facone et al., 2020). El programa para la ejecución de la PCR del gen *tet(X)* constó de una desnaturalización inicial por 3 minutos a 96 °C, posterior, 30 ciclos de 96 °C

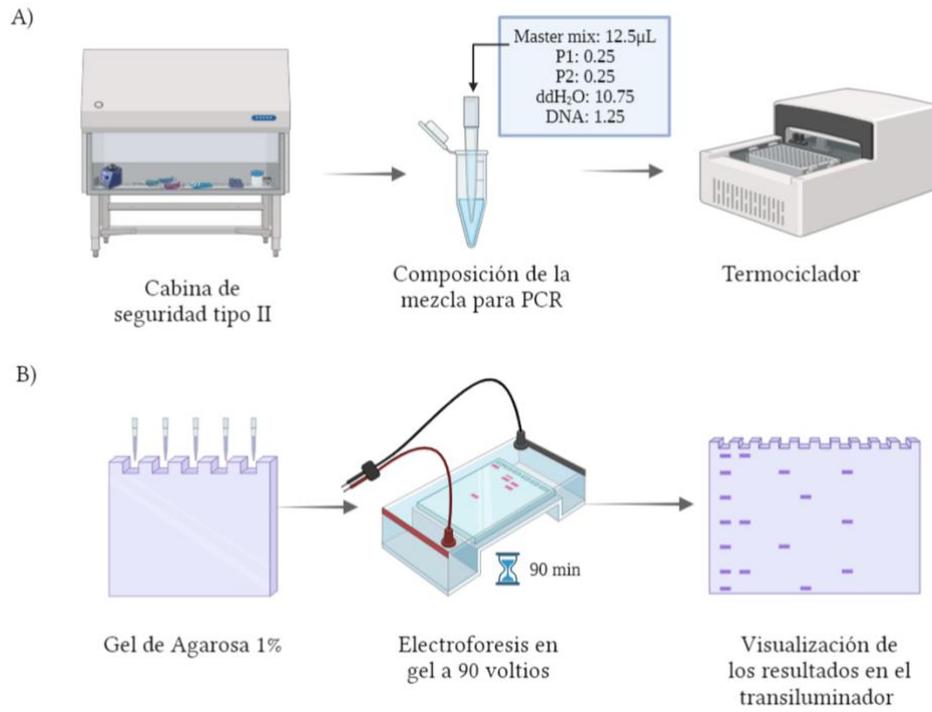
durante 30 segundos, seguido de un alineamiento a una temperatura descrita en la **Tabla 5** durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos (**Hsieh et al., 2021**).

El protocolo para los genes *tet(X3)* y *tet(X4)* se describe como: una desnaturalización inicial a 94 °C por 2.5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 15 segundos, alineamiento por 30 segundos, el detalle de las temperaturas de alineamiento se describe en la **Tabla 5**, una extensión a 72 °C durante 30 segundos y una elongación final a 72 °C por 7 minutos (**Li et al., 2021**).

Para cada uno de los genes se desarrolló una PCR con primers que se describen en la **Tabla 5**, al igual, compartieron el mismo volumen total de 12.5 µL de *DreamTaq PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EE. Fisher Scientific), 0.5 µL de cada cebador (stock 10 µM), 1.5 µL de agua de grado molecular libre de nucleasas (ddH₂O) (Thermo Fisher Scientific) y, 1.3 µL de ADN. Una vez obtenidos los productos de PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) teñido con SYBR Safe DNA Gel Stain (**Calero-Cáceres, Tadesse, et al., 2022**). Los resultados se evaluaron utilizando un transiluminador con luz UV luego de correr el gel por 2 horas a 90V con un marcador de peso molecular conocido que se corrió juntamente con las muestras. Hay que mencionar, que siempre se mantuvo controles positivos y negativos, siendo los positivos la muestra de ADN de la bacteria con resistencia a los diferentes antibióticos y el control negativo la muestra sin adición de ADN.

Figura 5.

Protocolo de PCR y Electroforesis en gel de Agarosa.



Nota. Identificación molecular de genes de resistencia antibiótica. A) Protocolo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). B) Ensayo de electroforesis en gel de agarosa 1%.

Tabla 5.

Secuencias de los primers empleados en la identificación molecular de β -lactamasas, carbapenemasas, tigeciclina y colistina.

Familia de genes	Gen	Orientación	Secuencia 5'- 3'	Tamaño del amplicón (pb)	T (°C) alineamiento	Referencia
Carbapenemasas	<i>bla_{OXA-48}</i>	Forward	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	438	56	(Poirel et al., 2011)
		Reverse	CATCAAGTTCAACCCAACCG			
	<i>bla_{VIM}</i>	Forward	GATGGTGTTTGGTCGCATA	390	56	(Poirel et al., 2011)
		Reverse	CGAATGCGCAGCACCAG			
	<i>bla_{IMP}</i>	Forward	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	232	56	(Poirel et al., 2011)
		Reverse	GGTTTAAAYAAAACAACCACC			
	<i>bla_{KPC}</i>	Forward	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	798	56	(Poirel et al., 2011)
		Reverse	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG			

Familia de genes	Gen	Orientación	Secuencia 5'-3'	Tamaño del amplicón (pb)	T (°C) alineamiento	Referencia
	<i>bla_{NDM}</i>	Forward	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	621	56	(Poirel et al., 2011)
		Reverse	CGGAATGGCTCATCACGATC			
β-lactamasas	<i>bla_{SHV}</i>	Forward	TTATCTCCCTGTTAGCCACC	795	55	(Jena et al., 2017)
		Reverse	GATTTGCTGATTTTCGCTCGG			
Fosfoetanolamin a transferasa	<i>mcr-1</i>	Forward	CGGTCAGTCCGTTTGTTTC	309	45	(Facone et al., 2020)
		Reverse	CTTGGTCGGTCTGTAGGG			
	<i>tet (X)</i>	Forward	TTCAGGTCAGGAAGCAATGAAAA	780	52	(Hsieh et al., 2021)
		Reverse	TTTACGCCTTGTCCTGCAAAAAGG			
Monooxigenasa dependiente de flavina	<i>tet(X3)</i>	Forward	TAATGGCGGGACATCAGG	294	56.7	(Li et al., 2021)
		Reverse	AGGCGACATCAAATGAGCAG			
	<i>tet(X4)</i>	Forward	CCGATATTCATCATCCAGAGG	328	57.2	(Li et al., 2021)
		Reverse	CGCTTACTTTTCCAAGACTTACCT			

Nota. Código IUPAC de las bases de nitrogenadas. A= Adenina. T= Timina. G= Guanina. C= Citosina. Y = C o T. R= A o G. S= G o C.

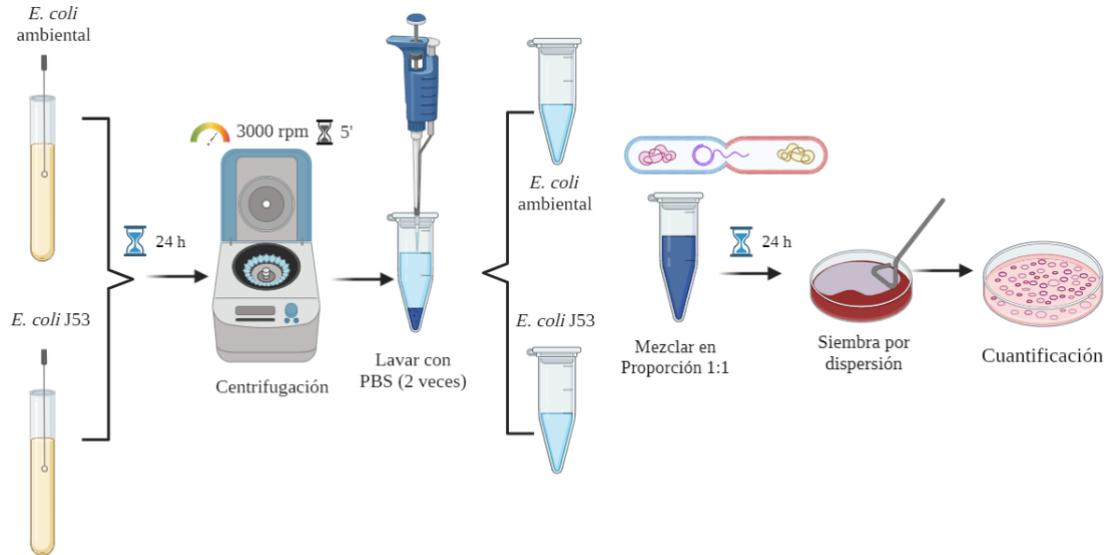
2.2.5. Ensayos de conjugación

Los aislamientos ambientales que presentaron los genes de interés se recuperaron en placas de agar MacConkey con Ceftriaxona 5 µg/mL (CRO) mediante la técnica de estría escocesa, para posteriormente inocular una colonia en 5 mL de caldo LB a 37 °C overnight. Luego se procedió a lavar las células dos veces con tampón PBS y se re-suspendió con LB suplementado con 5 µg/mL de CRO a una densidad óptica de 1.2 (Kohyama & Suzuki, 2019). Por otra parte, para la preparación de la cepa receptora *E. coli* J53 se recuperó en placas de agar MacConkey y, posteriormente, se inoculó en 5 mL de LB a 37°C overnight. Acto seguido, de igual forma se lavó dos veces con PBS y se re-suspendió en medio LB hasta alcanzar una densidad óptica de 1.2 (Guzman-Otazo et al., 2022).

Finalmente, las suspensiones donantes (aislados ambientales) y receptoras (*E. coli* J53) se mezclaron en una relación 1:1 en tubo eppendorf estéril para su posterior incubación a 37°C overnight. Con el fin de comprobar la resistencia antibiótica adquirida por la cepa receptora se sembró en placas con medio de cultivo agar MacConkey suplementado con 5 µg/mL de CRO y 150 µg/mL de azida sódica (AZ) en función de la técnica de diluciones seriadas. En este punto, también se aplicaron controles tanto para la cepa receptora como para el donante. Por último, se realizaron purificaciones de las colonias de color fucsia que presentaron la morfología característica de *E. coli* en el medio de cultivo para su posterior criopreservación a -80°C (Suhartono & Savin, 2016).

Figura 6.

Método de conjugación bacteriana.



2.2.6. Eficiencia de la conjugación

La eficiencia se realizó mediante cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC) por mL, tanto de la cepa receptora como del producto de conjugación (Guzmanotazo et al., 2022).

$$\%Eficiencia = \frac{UFC / mL \text{ de transconjugados}}{UFC / mL \text{ de } E. coli \text{ J53}} * 100$$

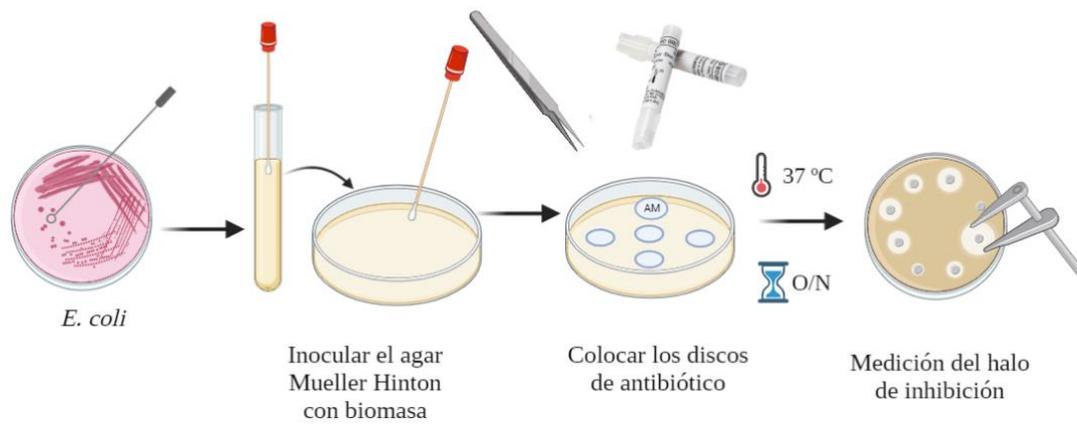
2.2.7. Perfiles de resistencia fenotípicos

El análisis del perfil de resistencia se realizó mediante el método de Kirby-Bauer de los transconjugados para determinar la sensibilidad a los antibióticos ampicilina (AMP), amoxicilina (AMC), piperacilina/tazobactam (TPZ), ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX), cefepima (FEP), aztreonam (ATM), ertapenem (ERT), imipenem (IPM), meropenem (MEM), amikacina (AMK), gentamicina (GEN), ciprofloxacina

(CIP) y trimetoprima/sulfametoxazol (SXT) (Ovejero et al., 2017). Para el cual, se generó biomasa en caldo LB del banco de cepas del ensayo de conjugación hasta alcanzar un valor de 0.5 en la escala McFarland (CLSI, 2023).

Figura 7.

Protocolo de evaluación de perfiles de resistencia fenotípica.



Para la interpretación de los perfiles fenotípicos se realizó en base a su susceptibilidad a antibióticos reportados como resistentes (R), intermedios (I) o sensibles (S) para cada antibiótico según el Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) (CLSI, 2023).

2.2.7.1. Microdilución en caldo de colistina

La estandarización de la técnica de microdilución en caldo de colistina se llevó a cabo para su aplicación en placas. Para lo cual, se prepararon diferentes viales de solución madre (MS) con una concentración de 1002.75 µg/mL, disolviendo el sulfato de colistina en un disolvente adecuado, en este caso agua. Las soluciones madre fueron almacenadas a -80 °C. Inmediatamente después de utilizar un vial de MS para preparar las placas de colistina, este fue descartado.

La solución de trabajo (ST) se preparó a una concentración de 8 µg/mL a partir de la MS. Se preparó medio Mueller Hinton el mismo día de la placa. Se realizaron diluciones seriadas a partir de la ST para obtener concentraciones finales en el pocillo de 4, 2, 1 y 0.5 µg/mL (CLSI, 2023).

Las cepas de *E. coli* con genes *mcr-1* positivos se sembraron en agar MacConkey suplementado con CRO, mientras que las cepas conjugadas resultantes, se sembraron en agar MacConkey suplementado con CRO y AZ, y se incubó a 37°C overnight. Luego, se preparó soluciones bacterianas con solución salina 0.9 % a una concentración de 0.5 escala McFarland que equivale a 1.5×10^8 UFC/mL. Seguidamente se realizó una dilución 1:100 para obtener una concentración final de solución bacteriana de 1.5×10^6 UFC/mL. Se tomaron 50 µL de solución bacteriana y se colocaron en los pocillos desde la concentración de 1 a 4 µg/mL, luego se añadió 50 µL de dilución con el antibiótico hasta obtener un volumen final de 100 µL. Las microplacas se incubaron a 37 °C de 18 a 24 horas.

Tabla 6.

Modelo de placa de microdilución con 4 concentraciones para 8 muestras

Filas (COL µg/mL)	Columnas (Muestras)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A (4)								
B (2)								
C (1)								
D (0.5)								

Conjuntamente, se realizó un control con una cepa de *E. coli* ATCC BAA-3170, misma que no llevó antibiótico, para verificar el crecimiento confluyente (CLSI, 2023).

Figura 8.

Protocolo de microdilución en caldo.



2.2.7.2. Lectura de placas

La lectura de placas se realizó luego de 24 horas de incubación de acuerdo con el crecimiento bacteriano en cada pocillo, con la ayuda de luz transmitida. Además, se tomó en cuenta los puntos de corte de concentración mínima inhibitoria (CIM) que se presentan en la **Tabla 6 (CLSI, 2023)**.

Tabla 7.

Punto de Corte CIM para colistina en E. coli.

Antibiótico	Punto de corte CIM (µg/mL)		
	S	I	R
Colistina	-	≤ 2	≥ 4

Nota. La susceptibilidad al antibiótico de colistina está clasificada por tres categorías, siendo S: sensible, I: Intermedia, y R: resistente.

2.2.8. Perfiles de resistencia Genotípico

La generación de biomasa se realizó a partir de los transconjugados empleando el protocolo tal como se describe en la sección 2.2.2. De igual forma, la extracción de ADN de cada una de las cepas previamente seleccionados, a partir del criterio del análisis de resistencia por el método de Kirby-Bauer, siguió el protocolo descrito en la sección 2.2.3.

Es así como posteriormente se desarrolló el protocolo de la sección 2.2.4 para identificar los genes que otorgan la resistencia antibiótica a las cepas transconjugantes y, su subsecuente análisis en el gel de electroforesis. Se debe mencionar que adicionalmente se verificó la presencia de los genes de betalactamasas *bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M}, habitualmente presentes en los aislamientos BLEE. El proceso aplicado se compone de: una desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 15 segundos, una etapa alineamiento por 1 minuto con una temperatura descrita en la **Tabla 6**, una extensión a 72 °C durante 1 minutos y una elongación final a 72 °C por 10 minutos (Colomer-Lluch et al., 2011).

Tabla 8.

Secuencias de primers de los genes de resistencia a antibióticos adicionales empleados en la PCR.

Familia de Genes	Gen	Orientación	Secuencia 5' - 3'	Tamaño del amplicón (pb)	T (°C) alineamiento	Referencia
β-Lactamasas	<i>bla_{CTX-M}</i>	Forward	ATGTGCAGYACCAGTAARGT	593	50	(Colomer-Lluch et al., 2011)
	general	Reverse	TGGGTRAARTARGTSACCAGA			
	<i>bla_{TEM}</i>	Forward	CTCACCCAGAAACGCTGGTG	569	63	(Colomer-Lluch et al., 2011)
		Reverse	ATCCGCCTCCATCCAGTCTA			
Polimixinas	<i>bla_{CMY}</i>	Forward	ATGATGAAAAAATCGTTATGCT	462	53	(Cejas et al., 2014)
		Reverse	TTGCAGCTTTTCAAGAATGC			
	<i>mcr-9</i>	Forward	TTCCCTTTGTTCTGGTTG	1011	55	(Cavaco et al., 2016)
		Reverse	GTATAGCTTGCCGGAAGTCG			
<i>mcr-10</i>	Forward	GGACCGACCTATTACCAGCG	365	56		

Familia de Genes	Gen	Orientación	Secuencia 5' - 3'	Tamaño del amplicón (pb)	T (°C) alineamiento	Referencia
		Reverse	GCAGGTAATAAGTCGGTC			(Di Francesco et al., 2023)
Sulfonamidas	<i>sulI</i>	Forward	TTCATGGGCAAAAGCTTGATG	964	43	(Calero-Cáceres, 2016)
		Reverse	GGCCGGAAGGTGAATGCTA			
Quinolonas	<i>qnrA</i>	Forward	ACGCCAGGATTTGAGTGAC	565	49	(Peymani et al., 2015)
		Reverse	CCAGGCACAGATCTTGAC			
	<i>qnrS</i>	Forward	TTAAGTCTGACTCTTTCAGTGATG	425	53	(Colomer-Lluch et al., 2014)
		Reverse	CGTTTTCAAGAATGCGCCAGG			
Tetraciclinas	<i>tetA</i>	Forward	TTGGCATTCTGCATTCCTC	494	55	(Afsharnia et al., 2018)
		Reverse	GTATAGCTTGCCGGAAGTCG			

Nota. Código IUPAC de las bases de nitrogenadas. A= Adenina. T= Timina. G= Guanina. C= Citosina. Y = C o T. R= A o G. S= G o C.

2.2.9. Tipificación molecular por el Consenso Intergénico Repetitivo de Enterobacterias (ERIC) PCR

Para confirmar que los aislamientos obtenidos mediante transconjugación corresponden efectivamente a la bacteria receptora empleada, que en este caso es *E. coli* J53, se llevó a cabo una tipificación molecular mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Repeticiones Interpuestas de Secuencias Extragenómicas (ERIC-PCR). En la PCR se emplearon cebadores ERIC específicos (Primer forward 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3' y primer reverse 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'). La amplificación se llevó a cabo con una desnaturalización inicial durante 5 min a 94 °C; 30 ciclos de desnaturalización de 30 s a 94 °C, hibridación de los primers por 30 s a 55 °C, extensión a 30 s a 72 °C; y extensión final de 16 min a 72 °C en termociclador. El producto amplificado resultante se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) (**Ramakrishnan et al., 2022**).

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Identificación de *E. coli* portadores de genes de resistencia a carbapenémicos, tigeciclina y colistina.

En este estudio, se examinaron un total de 203 aislamientos de *E. coli*. Posteriormente, se realizaron pruebas bioquímicas para la identificación de enterobacterias, lo que resultó en la exclusión de 3 cepas (**Anexo 1**). Como resultado, se corroboró que los 200 aislamientos restantes correspondían a *E. coli*.

La detección de *E. coli* portadoras de genes de resistencia a carbapenémicos se centró específicamente en los genes *bla*_{KPC} de la clase A, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} y *bla*_{NDM} de la clase de las metalo-betalactamasas, y *bla*_{OXA-48} de la clase D, debido a que estos genes se encuentran especialmente en enterobacterias gramnegativas (**González et al., 2020**). Estos genes son conocidos por inhibir la actividad de los antibióticos carbapenémicos, que se usan para tratar infecciones nosocomiales e infecciones causadas por bacterias multirresistentes considerándose altamente efectivos y de uso recurrente en la terapia antimicrobiana (**Sacsquispe & Bailón, 2018**). Por su parte también, se analizó un gen de resistencia a β -lactámicos, correspondiente al gen *bla*_{SHV}, que tiene la capacidad de hidrolizar carbapenémicos. En la colección evaluada tan solo se encontraron aislamientos positivos para el gen *bla*_{OXA-48} (n=1) (**Anexo 2**) y para *bla*_{SHV} (n=2) (**Anexo 3**) de acuerdo con la **Tabla 9**.

En el mismo contexto, se llevó a cabo un análisis de los genes de resistencia móvil a la colistina, específicamente para los genes *mcr-1*, *mcr-9* y *mcr-10*, considerando que se tratan de las variantes más diseminadas a nivel global. Estos mecanismos de

resistencia son de origen reciente y su diseminación global es alarmante (Furlan et al., 2023). De las 200 cepas analizadas en el estudio, solamente se identificaron tres aislamientos portadores del gen *mcr-1* (**Anexo 4**), equivalente al 1.5% de aislamientos positivos a este gen.

Además, se investigaron los genes de resistencia móvil a la tigeciclina, centrándose en los genes *tet(X)*, *tet(X3)* y *tet(X4)*, el cual inhibe la acción de las tetraciclinas, incluyendo la tigeciclina, que es el principal representante de las tetraciclinas de tercera generación. Se analizó este gen debido a que la tigeciclina es un antibiótico de último recurso utilizado para combatir patógenos resistentes a las tetraciclinas de primera y segunda generación, así como la diseminación global de estos genes es epidemiológicamente prioritaria (**Aminov, 2021**). Es importante mencionar que, a partir del análisis realizado de estos genes, no se encontró ningún aislamiento positivo como se muestra en la **Tabla 9**.

Tabla 9.

Frecuencia de genes de resistencia a antibióticos identificados.

Familia de antibióticos	Gen	Presencia del gen (%)	
		Si	No
Carbapenémicos	<i>bla_{OXA-48}</i>	1 (0,5)	199 (99,5)
	<i>bla_{VIM}</i>	0 (0,0)	200 (100,0)
	<i>bla_{IMP}</i>	0 (0,0)	200 (100,0)
	<i>bla_{KPC}</i>	0 (0,0)	200 (100,0)
	<i>bla_{NDM}</i>	0 (0,0)	200 (100,0)
β-lactámicos	<i>bla_{SHV}</i>	2 (1,0)	198 (99,0)
	<i>mcr-1</i>	3 (1,5)	197 (98,5)
Polimixinas	<i>mcr-9</i>	0 (0,0)	200 (100,0)
	<i>mcr-10</i>	0 (0,0)	200 (100,0)
Tetraciclinas	<i>tet(X)</i> general	0 (0,0)	200 (100,0)

Familia de antibióticos	Gen	Presencia del gen (%)	
		Si	No
	<i>tet(X3)</i>	0 (0,0)	200 (100,0)
	<i>tet(X4)</i>	0 (0,0)	200 (100,0)

Nota. Los porcentajes pertenecen al total de aislamientos analizados (n=200) frente al número de aislados positivos para cada gen de resistencia antibiótica.

El presente estudio representa el primer reporte de un aislamiento de *E. coli* de origen ambiental portador del gen *bla*_{OXA-48} en el Ecuador (aislamiento 17-A). Este gen de resistencia ha sido detectado previamente en aislamientos de *K. pneumoniae* procedentes de muestras animales, muestras clínicas, y muestras ambientales, mientras que, también se ha detectado a nivel de Sudamérica en muestras clínicas en *Raoultella ornithinolytica* (Reyes et al., 2020; Tamayo et al., 2022). En *E. coli*, un reciente reporte identificó la presencia de este gen en combinación con el gen *mcr-1* en aislamientos de origen avícola de la provincia de Pastaza (Bastidas-Caldes et al., 2023). Por lo tanto, el hallazgo de *bla*_{OXA-48} en una cepa de *E. coli* de origen ambiental en nuestro estudio subraya la necesidad de una vigilancia continuada y de mayor envergadura, especialmente en contextos ambientales.

En otros países, desde la primera detección de este gen en la década de los 2000, los genes *bla*_{OXA-48} han sido detectados en especial en Enterobacterales de entornos clínicos (Tacão et al., 2013). A nivel geográfico, en Europa, norte de África, y Medio Oriente, las enzimas OXA-48 representan las carbapenemasas más prevalentes en Enterobacterales (Boyd et al., 2022). En el medio ambiente, la presencia del gen *bla*_{OXA-48} en enterobacterias ha sido frecuentemente asociada a ecosistemas impactados por aguas residuales y efluentes de plantas de tratamiento de origen hospitalario en países como Austria, Argelia, Túnez, Suiza y Alemania (Pitout et al., 2019). La detección de Enterobacterales portadores de este tipo de carbapenemasas en aguas residuales de hospitales constituye una medida preventiva para identificar brotes clínicos en etapas tempranas (Villacís et al., 2020).

La presencia del gen *mcr-1* en tres aislados de *E. coli* obtenidas de muestras del río Cutuchi guarda concordancia con el estudio ejecutado en el mismo río en el año 2018, el cual representó el primer reporte ambiental de aislamientos portadores de este gen en Ecuador (**Calero-Cáceres, Tadesse, et al., 2022**). Por la técnica de PCR utilizada, no es posible identificar a qué variante de *mcr-1* pertenecen las cepas aisladas en 2023. Sin embargo, en investigaciones complementarias a este estudio se realizará la caracterización de los genomas completos de los aislamientos 62, 63, y 102; con la finalidad de identificar las características de estos aislamientos y evaluar si existen diferencias genómicas con los aislados obtenidos en el 2018.

Desde su detección inicial y diseminación global en el año 2016, los Enterobacterales portadores de variantes del gen *mcr* se han diseminado de forma global. Sin embargo, su diseminación ambiental ha sido evaluada de manera parcial (**Cherak et al., 2021**). Considerando el rol de las aguas como un medio de interconexión entre diferentes ambientes, permitiendo a las mismas diseminar microorganismos entre el medio natural, y los seres humanos y animales, es necesario investigar de una manera profunda su implicación en la evolución de estos mecanismos de resistencia (**Rhouma et al., 2023**).

Por otro lado, la ausencia de detección de los genes de resistencia *mcr-9* y *mcr-10* podría explicarse por el hecho de que estos genes fueron descubiertos recientemente: *mcr-9* en *Salmonella* en 2019 y *mcr-10* en *Enterobacter* en 2020 (**Hussein et al., 2021**). Sin embargo, otra explicación plausible puede ser que la cantidad de aislamientos evaluados y los entornos estudiados tan sólo sean un reflejo de la punta del iceberg de la diseminación de microorganismos en el país.

La ausencia de detección de aislados portadores del gen *tet* (X) y sus ortólogos *tet* (X3) y *tet* (X4) puede ser explicada ya que hasta el momento no se ha detectado cepas de *E. coli* que posean genes de resistencia a tetraciclinas de tercera generación en el país (**J. Reyes et al., 2021; Vinueza-Burgos et al., 2019**). Además, solo en tres países a nivel de Latinoamérica se han identificado los genes de resistencia *tet*(X), *tet* (X1) y *tet* (X2) en cepas de *K. pneumoniae* de origen animal (**Fang et al., 2020**).

La falta de detección de genes de resistencia a carbapenémicos como *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{KPC}*, y *bla_{NDM}* puede deberse al reciente descubrimiento de estos genes en muestras de pacientes con infecciones del tracto urinario en diferentes hospitales del país (Tamayo et al., 2022). Es importante destacar que las muestras procesadas en el estudio en cuestión se obtuvieron de un afluyente de la sierra central, donde, a pesar de la elevada contaminación, parece existir una baja presión selectiva en estos ecosistemas dinámicos.

3.2. Ensayos de transconjugación utilizando biomasa proveniente de aislamientos seleccionados y la bacteria receptora *E. coli* J53.

Para esta etapa de la investigación, se trabajó con los aislamientos de *E. coli* 62, 63 y 102 (portadoras de *mcr-1*), 13-A y 29-A (portadoras de *bla_{SHV}*), y 17-A (portadora de *bla_{OXA-48}*) (Anexo 5). Utilizando la cepa *E. coli* J53 como receptora, se obtuvieron eventos de transconjugación exitosa para todos los aislamientos, con excepción de 13-A portadora del gen *bla_{SHV}*, verificado por PCR de las cepas conjugadas (Tabla 10). Esto sugiere que la ubicación de los ARGs en estudio en las cepas restantes probablemente se encuentra en sus plásmidos.

La tasa de transferencia genética horizontal de plásmidos, o número de eventos exitosos de conjugación refleja el porcentaje de transconjugantes obtenidos en cada experimento. En este caso, al trabajar con ceftriaxona como antibiótico de cribado de los transconjugados, cuantificamos a aquellos microorganismos con fenotipo de resistencia a mencionado antibiótico. Con respecto a la frecuencia de transconjugación, los valores más altos fueron para los aislamientos 13-A y 63, con porcentajes superiores al 35%. Para el aislamiento 62, se obtuvo un porcentaje del 17.97%, y porcentajes menores al 6% para los aislamientos 29-A, 102, y 17-A. La eficiencia de conjugación depende de diversos factores, relacionados con la compatibilidad de las cepas donantes y receptoras, la compatibilidad de los plásmidos, el contacto entre células donadoras y receptoras, la cantidad de copias de plásmidos presentes en las células donadoras, la presión de antibiótico, así como de otras características abióticas (Benz et al., 2021; Xiao et al., 2022).

Tabla 10.*Eficiencia de conjugación*

Número de ensayo	Cepa receptora <i>E. coli</i> J53		Cepa Conjugada			Frecuencia de transconjugación		ARGs presentes en los conjugados
	UFC/mL	SD	Código	UFC/mL	SD	UFC/mL	(%)	
1	1.23x10 ⁸	1.77x10 ¹	62-J53	2.21x10 ⁷	1.27x10 ¹	1.80 x 10 ⁻¹	17.97	<i>mcr-1</i> (+)
2	1.22x10 ⁸	1.77x10 ¹	63-J53	4.29x10 ⁷	1.27x10 ¹	3.52 x 10 ⁻¹	35.16	<i>mcr-1</i> (+)
3	1.69x10 ⁸	4.81x10 ¹	102-J53	4.55x10 ⁴	6.36x10 ⁰	2.69 x 10 ⁻⁴	0.03	<i>mcr-1</i> (+)
4	1.68x10 ⁸	4.53x10 ¹	13-J53	6.10x10 ⁷	1.27x10 ²	3.63 x 10 ⁻¹	36.31	<i>bla_{SHV}</i> (-)
5	1.69x10 ⁸	4.53x10 ¹	29-J53	9.50x10 ⁶	1.20x10 ²	5.62 x 10 ⁻²	5.62	<i>bla_{SHV}</i> (+)
6	1.45x10 ⁸	1.27x10 ¹	17-J53	3.00x10 ⁴	1.41x10 ⁰	2.07 x 10 ⁻⁴	0.02	<i>bla_{OXA-48}</i> (+)

El recuento en placa de las unidades formadoras de colonia (UFC) por mL se reporta para la cepa receptora que se utilizó por cada ensayo de conjugación y, de igual forma la cuantificación de las cepas conjugadas en el agar MacConkey suplementado con azida de sodio (AZ) y ceftriaxona (CRO). *Nota.* La frecuencia de transconjugación se expresa como UFC/mL codificación de los transconjugados incluye el número de la cepa ambiental y la terminación J53 de la cepa receptora (*E. Coli* J53)

En relación a la ubicación de los ARGs examinados, la familia de genes *mcr* es habitualmente detectada en plásmidos de diferentes variantes, como IncI, IncA, IncF, IncH, IncX, IncN, IncR, IncY, IncQ, IncP, Col, e IncB (Calero-Cáceres, Rodríguez, et al., 2022). Los estudios sobre aislamientos provenientes de muestras ambientales en Latinoamérica han evidenciado con frecuencia la existencia del gen *mcr-1* en plásmidos de tipo IncI2 e IncX4 (Furlan et al., 2023).

En el caso de *bla_{OXA-48}*, los plásmidos son el vehículo principal para la transmisión y propagación de este gen (Boyd et al., 2022). Este mecanismo se confirma en el aislamiento 17-A, que se alinea con los hallazgos previos. Se ha observado que varios tipos de plásmidos albergan al gen *bla_{OXA-48}*, incluidos los plásmidos IncL, IncA/C, IncF, ColKP3, ColE2, IncX3, IncN1, e IncT (Pitout et al., 2019). El gen *bla_{OXA-48}* se encuentra comúnmente en plásmidos auto-conjugables de 60 a 70 kb que presentan una estructura IncL (Hamprecht et al., 2019; Mataseje et al., 2018; Pitout et al., 2019). Estos hallazgos resaltan la importancia de la vigilancia de estos vectores de transmisión genética en el esfuerzo por controlar la propagación de resistencia a los antibióticos.

En relación a *bla_{SHV}*, diversos estudios han demostrado que la diseminación de este gen y sus variantes se encuentra mediada por plásmidos o expresada de forma cromosómica (Gundran et al., 2019; Martínez, 2021). Esta evidencia se pudo confirmar con los resultados obtenidos a partir del aislamiento 29-A, que muestra la presencia del gen en la cepa transconjugada, en contraste con el aislamiento 13-A, donde no se encuentra presente. Se ha observado que dentro de la familia SHV existen 172 tipos de enzimas, de las cuales 45 se encuentran alojadas en elementos transferibles. Entre estos elementos, el plásmido más frecuentemente asociado al gen *bla_{SHV}* es el IncI-1 (Abbas, 2021; Alonso, 2019). Estos resultados, ayudan a reconocer la importancia de comprender estos procesos para desarrollar estrategias efectivas en la lucha contra la propagación de la RAM. Para precisar la ubicación de los genes evaluados en el presente estudio, es esencial la adquisición de las secuencias completas del genoma y su posterior evaluación bioinformática.

3.3. Evaluación de los perfiles de resistencia a antibióticos de los aislamientos seleccionados y de los transconjugados obtenidos por métodos fenotípicos y genotípicos

En el presente estudio se realizó un ensayo de ERIC-PCR y su posterior análisis mediante electroforesis en gel, del cual se obtuvieron diferentes patrones de bandas de ADN de los diferentes aislamientos. La construcción del árbol filogenético, por su parte, permitió visualizar el parentesco entre las cepas analizadas, clasificándolas en dos clados claramente distinguibles, donadores y conjugados. Simultáneamente, se evaluó la resistencia antimicrobiana y los genes que intervienen en la producción de enzimas responsables de la resistencia a antibióticos β -lactámicos y no β -lactámicos, obteniendo aislamientos multirresistentes (MDR) y extremadamente resistentes (XDR) (**Figura 9**).

El análisis de la susceptibilidad antimicrobiana permite conocer el perfil de resistencia de cada aislamiento y al mismo tiempo permite determinar el nivel de eficacia de ciertos antibióticos. En este estudio, se analizó los aislados seleccionados y sus transconjugantes, evaluando la actividad de 17 agentes antimicrobianos pertenecientes a 9 familias de antibióticos (**Anexo 6 y 7**). Con respecto al nivel de resistencia antimicrobiana, se determinó que todos los aislamientos donadores son resistentes a más del 50% de familias de antibióticos, destacándose los aminoglucósidos, cefalosporinas, penicilinas, sulfonamidas y monobactámicos, presentando un perfil XDR. Por el contrario, las cepas transconjugadas fueron resistentes a menos del 30% de familias de antibióticos siendo las cefalosporinas, penicilinas y monobactámicos, clasificándose como aislamientos MDR. La pérdida de resistencia depende de diversas razones, como la inestabilidad del plásmido en la célula receptora, la falta de presión selectiva por el antibiótico en un nuevo entorno, o incluso la activación de mecanismos de degradación del material genético transferido (**Graf et al., 2019**).

En relación con la susceptibilidad antimicrobiana, todas las cepas ambientales de los aislamientos positivos para *mcr-1* fueron resistentes a más del 60% de las familias de antibióticos, principalmente la familia de las polimixinas, aminoglucósidos, cefalosporinas, penicilinas, sulfonamidas y monobactámicos, clasificándose como aislamientos XDR (Extremo drogo-resistencia bacteriana). La causa principal de la resistencia son los plásmidos portadores de genes de resistencia, ya que se ha demostrado que los plásmidos que portan el gen *mcr-1*, pueden albergar otros genes de resistencia a β -lactámicos (**Zhang et al., 2022**).

En el caso de los aislados transconjugados portadores del gen *mcr-1*, se percibió un perfil de resistencia diferente a las cepas donadoras, ya que estos aislamientos presentaron resistencia a menos del 30% de las familias de antibióticos, presentando un mayor porcentaje de resistencia a la familia de las penicilinas, clasificándose como cepas MDR (**Anexo 7**). Cabe señalar que los aislados 62, 63 y sus conjugados se clasifican como resistentes en función de la CIM de colistina, la cual, es superior a 4 mg/L (**Calero-Cáceres, Tadesse, et al., 2022**). No obstante, el aislamiento 102 y su conjugado 102-J53 pese a tener el gen *mcr-1* no presentó esta característica fenotípica de resistencia (MIC < 0.5 mg/L). Este aislamiento que no presenta una resistencia completa puede estar regulado por los niveles de expresión del gen, por una modificación en la proteína objetivo del antibiótico, la falta de otros genes o mutaciones adicionales, la falta de presión selectiva del antibiótico y, en última instancia, la adaptación en progreso al proceso de resistencia (**Hoeksema et al., 2019**).

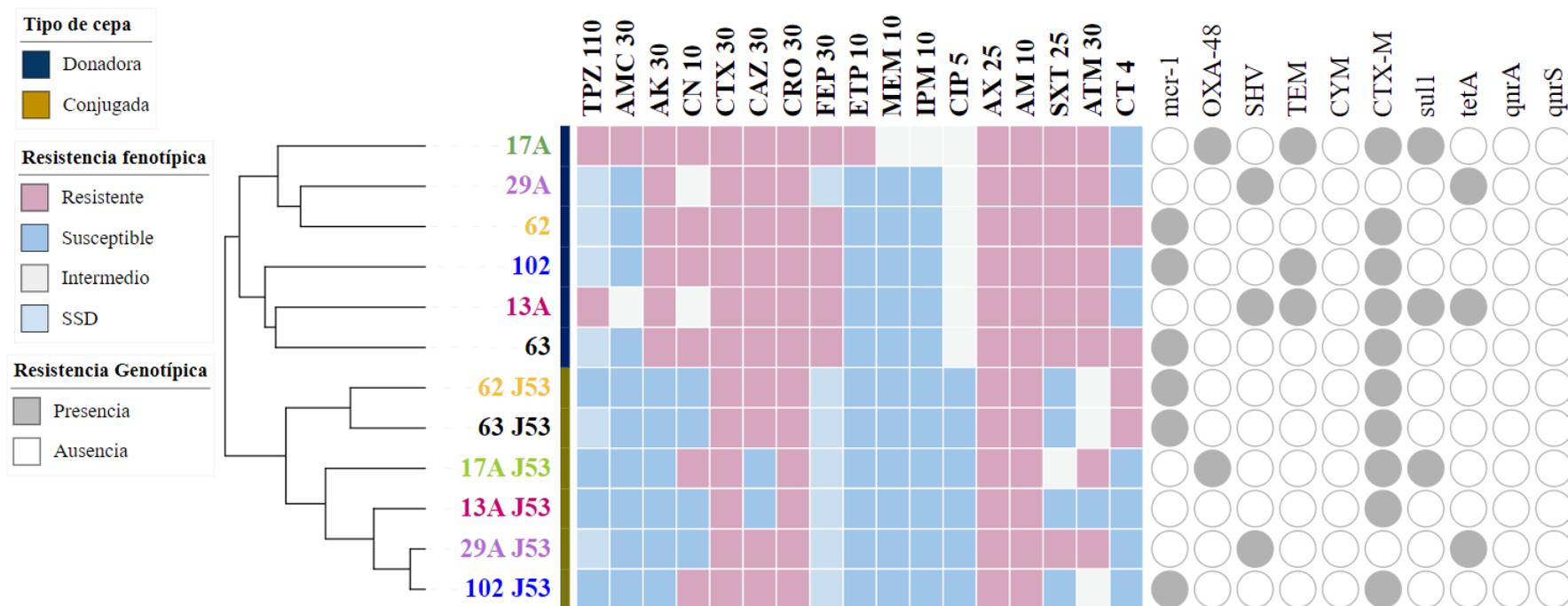
En definitiva, es preocupante que los aislamientos 62 y 63 muestren resistencia a antibióticos de espectro extendido y de último recurso, como lo son la colistina y la familia de cefalosporinas: de tercera generación (ceftriaxona, ceftazidima, cefotaxima) y cuarta generación (cefepima). Esta resistencia es motivo de especial atención debido a la importancia de estos medicamentos en el tratamiento de infecciones graves y potencialmente mortales.

El perfil de resistencia antimicrobiana del aislado positivo para el gen *bla*_{OXA-48}, reportó una alta tasa de resistencia a más del 60% de las familias de antibióticos en estudio. Entre las cuales se encuentran los agentes combinados β-lactámicos, aminoglucósidos, cefalosporinas, penicilinas, sulfonamidas y monobactámicos. No obstante, la frecuencia de resistencia a los carbapenémicos (33%) se dio únicamente al antibiótico ertapenem en el aislado donador. Según **Tacão et al. (2017)**, la propagación de esta carbapenemasa se produce de manera silenciosa debido a las dificultades en su detección. Factor que se pudo evidenciar en el aislado 17-A, ya que exhibió una resistencia intermedia a los antibióticos imipenem y meropenem, mientras que su conjugado (17A-J53) reflejó ser susceptible para los tres antibióticos carbapenémicos. El hecho de que los productores de OXA-48 muestren valores bajos de concentración inhibitoria mínima para los carbapenémicos podría estar enmascarando su detección y, por lo tanto, subestimando su dispersión (Papp-Wallace et al., 2019).

La resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación por parte del aislado *bla*_{OXA-48} positivo también puede estar asociada a la presencia de genes adicionales BLEE: *bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M}; puesto que, conforme lo señala **Villacís et al., (2020)** cerca del 80% (tasa que puede variar) de los aislamientos positivos para *bla*_{OXA-48} coproducen betalactamasas de espectro extendido.

Figura 9.

Dendrograma por análisis de ERIC-PCR y datos de los perfiles de resistencia fenotípico y genotípico.



El dendrograma se basa en el Coeficiente de similitud Dice con algoritmo de agrupamiento de promedios aritméticos (UPGMA). SSD: Susceptible dependiente de la dosis.

Nota. Los antibióticos se encuentran posicionados en función de la familia a la cual pertenecen: **Agentes combinados β -lactámicos:** TPZ (piperacilina/Tazobactam); AMC (Amoxicilina/Ácido Clavulánico); **Aminoglucósidos:** AK (Amikacina), CN (Gentamicina); **Cefalosporinas:** CTX (Cefotaxima), CAZ (Ceftazidima), CRO (Ceftriaxona), FEP (Cefepima); **Carbapenémicos:** ETP (Ertapenem), MEM (Meropenem), IMP (Imipenem); **Quinolonas:** CIP (Ciprofloxacina); **Penicilinas:** AM (Ampicilina), AX (Amoxicilina); **Sulfonamidas:** SXT (Trimetoprima/sulfametoxazol); **Monobactámicos:** ATM (Aztreonam) y **Polimixinas:** Colistina (CT)

Por otro lado, la ubicación del gen *bla_{SHV}* en la cepa 13-A, aparentemente en el cromosoma bacteriano, podría restringir su transferencia a otras cepas en comparación con aquellos genes presentes en plásmidos que pueden transmitirse horizontalmente entre bacterias. Esta ubicación hace que la propagación de la resistencia dependa de la reproducción bacteriana, potencialmente limitando su diseminación en comparación con las cepas que llevan el gen en plásmidos. Sin embargo, es crucial subrayar que la cepa de *E. coli* (13-A) en estudio exhibe otros genes que confieren resistencia a diferentes clases de antibióticos, incluyendo β -lactámicos (*bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*), sulfonamidas (*sul1*) y tetraciclinas (*tetA*). De acuerdo al estudio de **Tamayo et al., (2022)**, estos genes son comúnmente identificados en aislados clínicos derivados de pacientes con infecciones sistémicas, así como en muestras de aguas residuales hospitalarias.

El hallazgo de aislamientos bacterianos multirresistentes (MDR) y extremadamente resistentes (XDR) en cuerpos de agua del río Cutuchi y del canal Latacunga-Salcedo-Ambato, capaces de resistir antibióticos de amplio espectro y de última línea, subraya la urgencia de mantener una constante vigilancia y adoptar medidas efectivas para contener la propagación de la resistencia antimicrobiana a través de estos cuerpos de agua utilizados con fines agrícolas. Es imperativo que la investigación científica continúe enfocándose en optimizar los métodos de detección de la resistencia, profundizar la comprensión de sus mecanismos subyacentes y, por ende, elucidar las vías de diseminación de microorganismos multirresistentes.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- El análisis de la presencia de genes de resistencia a antibióticos reveló la existencia de aislamientos de *E. coli* resistentes a carbapenémicos, β -lactámicos y polimixinas en el efluente del río Cutuchi y del Canal Latacunga-Salcedo-Ambato. Sin embargo, se constató la ausencia de genes de resistencia a tigeciclina.
- El análisis de la presencia de genes de resistencia a antibióticos de último recurso demostró que 6 de las 200 cepas resistentes a ceftriaxona evaluadas presentan genes *bla*_{OXA-48}, *bla*_{SHV} y *mcr-1*. Este estudio marca un avance significativo en la comprensión de la diseminación de aislamientos productores de carbapenemasas en el país, dado que se registra, por primera vez, el aislamiento de una cepa de *E. coli* de origen ambiental en Ecuador que alberga el gen *bla*_{OXA-48} (aislamiento 17-A).
- En los ensayos de conjugación, se consiguió una transferencia exitosa en cada uno de los casos, registrando porcentajes variables de eficiencia en la conjugación. Sin embargo, tras realizar los ensayos de PCR, se descubrió que, a excepción de la cepa 13A, los demás aislamientos transmitían sus genes de resistencia a carbapenémicos, β -lactámicos o polimixinas. Estos hallazgos insinúan que los genes de resistencia investigados en las cepas restantes, muy probablemente, se encuentran localizados en sus plásmidos.
- Gracias a la evaluación de los perfiles de resistencia fenotípica y genotípica se evidenció cepas transconjugantes MDR y cepas donantes XDR. Además, se comprobó la presencia de genes de resistencia a antibióticos betalactámicos y no betalactámicos, que acompañan a los genes identificados inicialmente en este estudio.

4.2. Recomendaciones

- Analizar la secuencia del genoma completo de los plásmidos de las cepas donadoras y cepas transconjugadas con el fin de identificar sus características y entorno genético. De esta manera, será posible verificar la presencia de genes que regulan la resistencia, así como los factores que pueden facilitar o limitar la transferencia y posibles asociaciones con otros elementos genéticos.
- Verificar la ubicación específica de los diferentes genes de resistencia a antibióticos en la secuencia de ácidos nucleicos, lo que permitirá establecer comparaciones con aislados previamente reportados en Ecuador y así determinar su distribución genética. Con el fin de comprender la resistencia antibiótica en la región y proporcionar información relevante para combatir este problema.
- Evaluar la presencia de genes de resistencia en diferentes muestras provenientes de varios cuerpos de agua del Ecuador para un mejor monitoreo de la RAM.

C. MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias Bibliográficas

- Abbas, F. N. (2021). Molecular Detection of *bla*(SHV), *bla*(IMP) and *bla*(VIM) β -lactamases genes among *Klebsiella pneumoniae* strains. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*, 15(2), 2333–2339. <https://doi.org/10.37506/ijfmt.v15i2.14721>
- Abushaheen, M. A., Muzahed, Fatani, A. J., Alosaimi, M., Mansy, W., George, M., Acharya, S., Rathod, S., Divakar, D. D., Jhugroo, C., Vellappally, S., Khan, A. A., Shaik, J., & Jhugroo, P. (2020). Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Disease-a-Month*, 66(6). <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2020.100971>
- Adegoke, A. A., Madu, C. E., Aiyegoro, O. A., Stenström, T. A., & Okoh, A. I. (2020). Antibigram and beta-lactamase genes among cefotaxime resistant *E. coli* from wastewater treatment plant. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S13756-020-0702-4/FIGURES/3>
- Aditi, S., Kalanxhi, E., Kapoor, G., Craig, J., Balasubramanian, R., Brar, S., Criscuolo, N., Hamilton, A., Klein, E., Tseng, K., Van Boeckel, T., & Laxminarayan, R. (2021). The State of the World ' s Antibiotics 2021: A global analysis of antimicrobial resistance and its drivers. *Center for Disease Dynamics, Economics & Policy*, 8(2), 30–34.
- Afsharnia, M., Naraghi, B., Mardaneh, J., Kianmehr, M., & Biglari, H. (2018). The data of *Escherichia coli* strains genes in different types of wastewater. *Data in Brief*, 21, 763–766. <https://doi.org/10.1016/J.DIB.2018.08.167>
- Alawi, M., Torrijos, T. V., & Walsh, F. (2022a). Plasmid-mediated antimicrobial resistance in drinking water. *Environmental Advances*, 8, 100191. <https://doi.org/10.1016/J.ENVADV.2022.100191>
- Alawi, M., Torrijos, T. V., & Walsh, F. (2022b). Plasmid-mediated antimicrobial resistance in drinking water. *Environmental Advances*, 8, 100191.

<https://doi.org/10.1016/J.ENVADV.2022.100191>

Aljeldah, M. M. (2022). Antimicrobial Resistance and Its Spread Is a Global Threat. *Antibiotics*, *11*(8). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081082>

Alonso, C. A. (2019). *Epidemiología molecular en Escherichia coli procedente de fauna salvaje: resistencia antimicrobiana, virulencia y diversidad y diversidad genética* [Universidad de La Rioja]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=221324&info=resumen&idioma=ENG>

Aminov, R. (2021). Acquisition and spread of antimicrobial resistance: a *tet(X)* case study. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(8). <https://doi.org/10.3390/ijms22083905>

Arzanlou, M., Chai, W. C., & Venter, H. (2017). Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Essays in Biochemistry*, *61*(1), 49–59. <https://doi.org/10.1042/EBC20160063>

Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., Nisar, M. A., Alvi, R. F., Aslam, M. A., Qamar, M. U., Salamat, M. K. F., & Baloch, Z. (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. In *Infection and Drug Resistance* (Vol. 11, pp. 1645–1658). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>

Bastidas-Caldes, C., Cisneros-Vásquez, E., Zambrano, A., Mosquera-Maza, A., Calero-Cáceres, W., Yamamoto, Y., Yamamoto, M., Calvopiña, M., & de Waard, J. H. (2023). Co-Harboring of Beta-Lactamases and *mcr-1* Genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from Healthy Carriers and Backyard Animals in Rural Communities in Ecuador. *Antibiotics*, *12*(856). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12050856>

Benz, F., Huisman, J. S., Bakkeren, E., Herter, J. A., Stadler, T., Ackermann, M., Diard, M., Egli, A., Hall, A. R., Hardt, W. D., & Bonhoeffer, S. (2021). Plasmid- and strain-specific factors drive variation in ESBL-plasmid spread in vitro and in vivo. *ISME Journal*, *15*(3), 862–878. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00819-4>

- Berglund, B. (2015). Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. *Infection Ecology & Epidemiology*, 5, 28564. <https://doi.org/10.3402/iee.v5.28564>
- Boyd, S. E., Holmes, A., Peck, R., Livermore, D. M., & Hope, W. (2022). OXA-48-Like β -Lactamases: Global Epidemiology, Treatment Options, and Development Pipeline. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Vol. 66, Issue 8). <https://doi.org/10.1128/aac.00216-22>
- Breijyeh, Z., Jubeh, B., & Karaman, R. (2020). Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules*, 25(6). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25061340>
- Calero-Cáceres, W. (2016). *Evaluación de reservorios ambientales de partículas fágicas portadoras de genes de resistencia a antibióticos* (Issue October 2016). Universitat de Barcelona.
- Calero-Cáceres, W., & Balcázar, J. L. (2023). Evolution and dissemination of mobile colistin resistance genes : limitations and challenges in Latin American countries. *The Lancet Microbe*, 5247(23), 1–2. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(23\)00152-0](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(23)00152-0)
- Calero-Cáceres, W., Marti, E., Olivares-Pacheco, J., & Rodriguez-Rubio, L. (2022). Editorial: Antimicrobial Resistance in Aquatic Environments. *Frontiers in Microbiology*, 13(February), 1–3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.866268>
- Calero-Cáceres, W., Rodriguez, K., Medina, A. Y., Medina, J., Ortuño- Gutiérrez, N., Sunyoto, T., Dias, C., Bastidas-Caldes, C., Ramirez, M. S., & Harries, A. D. (2022). Genomic insights of *mcr-1* harboring *Escherichia coli* by geographical region and a *One-Health* perspective. *Frontiers in Microbiology*, 13, 5474. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.1032753>
- Calero-Cáceres, W., Tadesse, D., Jaramillo, K., Villavicencio, X., Mero, E., Lalaleo, L., Welsh, C., Villacís, J. E., Quentin, E., Parra, H., Ramirez, M. S., Harries, A. D., & Balcázar, J. L. (2022). Characterization of the genetic structure of *mcr-1* gene among *Escherichia coli* isolates recovered from surface waters and sediments from Ecuador. *Science of the Total Environment*, 806, 150566.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150566>

- Castañeda-Barba, S., Top, E. M., & Stalder, T. (2023). Plasmids , a molecular cornerstone of antimicrobial resistance in the *One Health* era. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00926-x>
- Cavaco, L., Mordhorst, H., & Hendriksen, R. (2016). Laboratory protocol: PCR for plasmid-mediated colistin resistance genes,. *DTU Food National Food Institute*, 2(October 2016), 1–15.
- Cejas, D., Vignoli, R., Quinteros, M., Marino, R., & Callejo, R. (2014). First detection of CMY-2 plasmid mediated β -lactamase in *Salmonella* Heidelberg in South America. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(1), 30–33.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2019). *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019* (pp. 95–96). Department of Health and Human Services, CDC.
- Cherak, Z., Loucif, L., Moussi, A., & Rolain, J. M. (2021). Epidemiology of mobile colistin resistance (*mcr*) genes in aquatic environments. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 27, 51–62. <https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2021.07.021>
- CLSI. (2023). *CLSI M100-ED33:2023 Estándares de desempeño para pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos*. <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>
- Colomer-Lluch, M., Calero-Cáceres, W., Jebri, S., Hmaied, F., Muniesa, M., & Jofre, J. (2014). Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fractions of Tunisian and Spanish wastewaters as markers to compare the antibiotic resistance patterns in each population. *Environment International*, 73, 167–175. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2014.07.003>
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., & Muniesa, M. (2011). Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PloS One*, 6(3), e17549. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017549>
- Dadgostar, P. (2019). Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *Infection and*

Drug Resistance, 12, 3903–3910. <https://doi.org/10.2147/IDR.S234610>

- De Oliveira, D. M. P., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N. A., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Paterson, D. L., & Walker, M. J. (2020). Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(3). <https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19/ASSET/CBA1C1D1-CF90-43DE-A9DF-32D24A4334AC/ASSETS/GRAPHIC/CMR.00181-19-F0001.JPEG>
- Delgado-Blas, J. F., Ovejero, C. M., David, S., Montero, N., Calero-Caceres, W., Garcillan-Barcia, M. P., de la Cruz, F., Muniesa, M., Aanensen, D. M., & Gonzalez-Zorn, B. (2021). Population genomics and antimicrobial resistance dynamics of *Escherichia coli* in wastewater and river environments. *Communications Biology*, 4(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01949-x>
- Di Francesco, A., Salvatore, D., Sakhria, S., Bertelloni, F., Catelli, E., Ben Yahia, S., & Tlatli, A. (2023). Colistin Resistance Genes in Broiler Chickens in Tunisia. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 13(8), 1409. <https://doi.org/10.3390/ANI13081409>
- Faccone, D., Rapoport, M., Albornoz, E., Celaya, F., De Mendieta, J., De Belder, D., Lucero, C., Gomez, S., Danze, D., Pasteran, F., & Corso, A. (2020). Plasmidic resistance to colistin mediated by *mcr-1* gene in *Escherichia coli* clinical isolates in Argentina: A retrospective study, 2012-2018. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 44. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.55>
- Fang, L. X., Chen, C., Cui, C. Y., Li, X. P., Zhang, Y., Liao, X. P., Sun, J., & Liu, Y. H. (2020). Emerging High-Level Tigecycline Resistance: Novel Tetracycline Destructases Spread via the Mobile *Tet(X)*. *BioEssays*, 42(8), 1–10. <https://doi.org/10.1002/bies.202000014>
- Furlan, J. P. R., Sellera, F. P., & Stehling, E. G. (2023). Trends of the environmental spread of *mcr* genes in Latin America. *The Lancet Microbe*. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(23\)00189-1](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(23)00189-1)
- GAD Latacunga. (2014). *Ordenanza para la descontaminación y protección de los ríos y afluentes hídricos del cantón Latacunga*.

<https://www.latacunga.gob.ec/fr/alcaldia.html?view=article&id=675&catid=85>

- González, Y., Huayán, G., Zavaleta-Verde, D., Mercado, P., & Castillo, R. (2020). Detección de genes de resistencia a carbapenémicos en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* aislados de un centro de salud de Trujillo-Perú. *Revista de Investigación Científica REBIOL*, 40(2), 160–169. <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/faccbbiol/article/view/3512/4169>
- Graf, F. E., Palm, M., Warringer, J., & Farewell, A. (2019). Inhibiting conjugation as a tool in the fight against antibiotic resistance. *Drug Development Research*, 80(1), 19–23. <https://doi.org/10.1002/ddr.21457>
- Gundran, R. S., Cardenio, P. A., Villanueva, M. A., Sison, F. B., & Benigno, C. C. (2019). Prevalence and distribution of *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} genes in extended-spectrum β -lactamase-producing *E. coli* isolates from broiler farms in the Philippines. *BMC Veterinary Research*, 1–8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s12917-019-1975-9>
- Guzman-otazo, J., Joffré, E., Agramont, J., Mamani, N., Jutkina, J., Boulund, F., Hu, Y. O. O., Jumilla-lorenz, D., Farewell, A., & Larsson, D. G. J. (2022). Conjugative transfer of multi-drug resistance IncN plasmids from environmental waterborne bacteria to *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, October, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.997849>
- Guzman-Otazo, J., Joffré, E., Agramont, J., Mamani, N., Jutkina, J., Boulund, F., Hu, Y. O. O., Jumilla-Lorenz, D., Farewell, A., Larsson, J., Flach, C.-F., Iñiguez Rojas, V. A., & Sjöling, Å. (2022). Conjugative transfer of multi-drug resistance IncN plasmids from environmental waterborne bacteria to *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 0, 4257. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.997849>
- Hamprecht, A., Sommer, J., Willmann, M., Brender, C., Stelzer, Y., Krause, F. F., Tsvetkov, T., Wild, F., Riedel-Christ, S., Kutschenreuter, J., Imirzalioglu, C., Gonzaga, A., Nübel, U., & Göttig, S. (2019). Pathogenicity of Clinical OXA-48 Isolates and Impact of the OXA-48 IncL Plasmid on Virulence and Bacterial Fitness. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02509>

- Hoeksema, M., Jonker, M. J., Brul, S., & Ter Kuile, B. H. (2019). Effects of a previously selected antibiotic resistance on mutations acquired during development of a second resistance in *Escherichia coli*. *BMC Genomics*, *20*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S12864-019-5648-7/FIGURES/4>
- Hooban, B., Joyce, A., Fitzhenry, K., Chique, C., & Morris, D. (2020). The role of the natural aquatic environment in the dissemination of extended spectrum beta-lactamase and carbapenemase encoding genes: A scoping review. *Water Research*, *180*, 115880. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2020.115880>
- Hsieh, Y. C., Wu, J. W., Chen, Y. Y., Quyen, T. L. T., Liao, W. C., Li, S. W., Chen, Y. C., & Pan, Y. J. (2021). An outbreak of *tet(X6)*-carrying tigecycline-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates with a new capsular type at a hospital in Taiwan. *Antibiotics*, *10*(10). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10101239/S1>
- Hussein, N. H., AL-Kadmy, I. M. S., Taha, B. M., & Hussein, J. D. (2021). Mobilized colistin resistance (*mcr*) genes from 1 to 10: a comprehensive review. *Molecular Biology Reports*, *48*(3), 2897–2907. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06307-y>
- INEC. (2021). Estadística de Información Ambiental Económica en Gobiernos Autónomos Descentralizados Municipales Gestión de Agua Potable y Saneamiento 2020 Resumen Estadístico. *Ecuador En Cifras*, 1–20. <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/gad-municipales/>
- Jasovský, D., Littmann, J., Zorzet, A., & Cars, O. (2016). Antimicrobial resistance—a threat to the world’s sustainable development. *Upsala Journal of Medical Sciences*, *121*(3), 159–164. <https://doi.org/10.1080/03009734.2016.1195900>
- Jena, J., Sahoo, R. K., Debata, N. K., & Subudhi, E. (2017). Prevalence of TEM, SHV, and CTX-M genes of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections in adults. *3 Biotech*, *7*(4). <https://doi.org/10.1007/S13205-017-0879-2>
- 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)

Kohyama, Y., & Suzuki, S. (2019). Conjugative gene transfer between nourished and starved cells of *Photobacterium damsela* ssp. *Damsela* and *Escherichia coli*. *Microbes and Environments*, 34(4), 388–392. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME19099>

Łapińska, U., Voliotis, M., Lee, K. K., Campey, A., Stone, R. M. L., Tuck, B., Phetsang, W., Zhang, B., Tsaneva-Atanasova, K., Blaskovich, M. A. T., & Pagliara, S. (2022). Fast bacterial growth reduces antibiotic accumulation and efficacy. *ELife*, 11, 1–33. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.74062>

Li, R., Lu, X., Peng, K., Liu, Z., Li, Y., Liu, Y., Xiao, X., & Wang, Z. (2020). Deciphering the Structural Diversity and Classification of the Mobile Tigecycline Resistance Gene *tet(X)*-Bearing Plasmidome among Bacteria. *MSystems*, 5(2). <https://doi.org/10.1128/msystems.00134-20>

Li, R., Mohsin, M., Lu, X., Abdullah, S., Munir, A., & Wang, Z. (2021). Emergence of Plasmid-Mediated Resistance Genes *tet(X)* and *mcr-1* in *Escherichia coli* Clinical Isolates from Pakistan. *MSphere*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00695-21>

Li, W., & Zhang, G. (2022). Detection and various environmental factors of antibiotic resistance gene horizontal transfer. *Environmental Research*, 212, 113267. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2022.113267>

Martínez, D. (2021). *Caracterización de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Escherichia coli aisladas de humanos y cerdos*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Mataseje, L. F., Boyd, D. A., Fuller, J., Haldane, D., Hoang, L., Lefebvre, B., Melano, R. G., Poutanen, S., Van Caesele, P., & Mulvey, M. R. (2018). Characterization of OXA-48-like carbapenemase producers in Canada, 2011-14. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(3). <https://doi.org/10.1093/jac/dkx462>

Mohsin, M., Hassan, B., Martins, W. M. B. S., Li, R., Abdullah, S., Sands, K., &

- Walsh, T. R. (2021). Emergence of plasmid-mediated tigecycline resistance *tet(X4)* gene in *Escherichia coli* isolated from poultry, food and the environment in South Asia. *Science of the Total Environment*, 787, 147613. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147613>
- Moore, S., & Barlow, I. (2019). *Inoculating a Liquid Bacterial Culture Protocol*. 1–2. <https://www.protocols.io/view/inoculating-a-liquid-bacterial-culture-q26g7bbnqlwz/v1>
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Olivares-Pacheco, J., Marti, E., Rodriguez-Rubio, L., & Calero-Cáceres, W. (2023). Editorial: Antimicrobial Resistance in Aquatic Environments, volume II. *Frontiers in Microbiology*, 14(1211464). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1211464>
- Organización Mundial de la Salud. (2021). *Patógenos multirresistentes que son prioritarios para la OMS - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud*. <https://www.paho.org/es/noticias/4-3-2021-patogenos-multirresistentes-que-son-prioritarios-para-oms>
- Ovejero, C. M., Delgado-Blas, J. F., Calero-Caceres, W., Muniesa, M., & Gonzalez-Zorn, B. (2017). Spread of *mcr-1* -carrying Enterobacteriaceae in sewage water from Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, dkw533. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw533>
- Papp-Wallace, K. M., Kumar, V., Zeiser, E. T., Becka, S. A., & van den Akker, F. (2019). Structural Analysis of The OXA-48 Carbapenemase Bound to A “Poor” Carbapenem Substrate, Doripenem. *Antibiotics 2019, Vol. 8, Page 145*, 8(3), 145. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS8030145>
- Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile Genetic

- Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4). <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
- Peymani, A., Farivar, T., Nikooei, L., Najafipour, R., Javadi, A., & Pahlevan, A. A. (2015). Emergence of plasmid-mediated quinolone-resistant determinants in *Klebsiella pneumoniae* isolates from Tehran and Qazvin provinces, Iran. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 56(2), E61. [/pmc/articles/PMC4718354/](https://doi.org/10.1007/s12187-015-0061-1)
- Pitout, J. D. D., Peirano, G., Kock, M. M., Strydom, K. A., & Matsumura, Y. (2019). The Global Ascendancy of OXA-48-Type Carbapenemases. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(1). <https://doi.org/10.1128/CMR.00102-19>
- 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>
- Pulingam, T., Parumasivam, T., Gazzali, A. M., Sulaiman, A. M., Chee, J. Y., Lakshmanan, M., Chin, C. F., & Sudesh, K. (2022). Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 170, 106103. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2021.106103>
- Ramakrishnan, V., Marialouis, X. A., Al-Ansari, M. M., Al-Humaid, L., Santhanam, A., & Obulisamy, P. K. (2022). Multilocus sequence typing and ERIC-PCR fingerprinting of virulent clinical isolates of uropathogenic multidrug resistant *Escherichia coli*. *Journal of King Saud University - Science*, 34(3), 101874. <https://doi.org/10.1016/J.JKSUS.2022.101874>
- Reyes, J. A., Villavicencio, F., Villacís, J. E., Pavón, E., Campoverde, N., Espinel, M., Núñez, B., & Trueba, G. (2020). First report of a clinical isolate of *bla*_{OXA-48}-carbapenemase producing *Raoultella ornithinolytica* in South America. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(1), 82–83. <https://doi.org/10.1016/J.RAM.2019.02.002>
- Reyes, J., Cárdenas, P., Tamayo, R., Villavicencio, F., Aguilar, A., Melano, R. G., & Trueba, G. (2021). Characterization of *bla*_{K_{PC-2}}-Harboring *Klebsiella*

pneumoniae Isolates and Mobile Genetic Elements from Outbreaks in a Hospital in Ecuador. *Microbial Drug Resistance*, 27(6), 752–759. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0433>

Rhouma, M., Madec, J. Y., & Laxminarayan, R. (2023). Colistin: from the shadows to a *One Health* approach for addressing antimicrobial resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 61(2), 106713. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2023.106713>

Sacsquispe, R., & Bailón, H. (2018). Identificación de genes de resistencia a carbapenémicos en enterobacterias de Hospitales de Perú, 2013-2017. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*, 35(2), 259–264. <https://doi.org/10.17843/rpmesp>

Sánchez-Salazar, E., Gudiño, M. E., Sevillano, G., Zurita, J., Guerrero-López, R., Jaramillo, K., & Calero-Cáceres, W. (2020). Antibiotic resistance of *Salmonella* strains from layer poultry farms in central Ecuador. *Journal of Applied Microbiology*, 128(5), 1347–1354. <https://doi.org/10.1111/jam.14562>

Schaenzer, A. J., & Wright, G. D. (2020). Antibiotic Resistance by Enzymatic Modification of Antibiotic Targets. *Trends in Molecular Medicine*, 26(8), 768–782. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.05.001>

Soni, K., Jyoti, K., Chandra, H., & Chandra, R. (2022). Bacterial antibiotic resistance in municipal wastewater treatment plant; mechanism and its impacts on human health and economy. *Bioresource Technology Reports*, 19(May), 101080. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101080>

Suhartono, S., & Savin, M. (2016). Conjugative transmission of antibiotic-resistance from stream water *Escherichia coli* as related to number of sulfamethoxazole but not class 1 and 2 integrase genes. *Mobile Genetic Elements*, 6(6), e1256851. <https://doi.org/10.1080/2159256X.2016.1256851>

Tacão, M., Correia, A., & Henriques, I. (2013). Environmental *Shewanella xiamenensis* strains that carry *bla*_{OXA-48} or *bla*_{OXA-204} genes: Additional proof for *bla*_{OXA-48}-Like gene origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(12), 6399–6400. <https://doi.org/10.1128/AAC.00771-13>

Tacão, M., Silva, I., & Henriques, I. (2017). Culture-independent methods reveal high

diversity of OXA-48-like genes in water environments. *Journal of Water and Health*, 15(4), 519–525. <https://doi.org/10.2166/WH.2017.260>

Taco, M. S., & Ushiña, B. (2023). Calidad Microbiológica del agua en el Río Cutuchi de dos comunidades de área agrícola en la provincia de Cotopaxi y su posible implicación en la salud Humana. [Universidad Politecnica Salesiana]. In *Aleph* (Vol. 87, Issue 1,2). [https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/167638/341506.pdf?sequence=1&isAllowed=y%0Ahttps://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/8314/LOEBLEIN%2C LUCINEIA CARLA.pdf?sequence=1&isAllowed=y%0Ahttps://antigo.mdr.gov.br/saneamento/proeesa/90](https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/167638/341506.pdf?sequence=1&isAllowed=y%0Ahttps://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/8314/LOEBLEIN%2C%20LUCINEIA%20CARLA.pdf?sequence=1&isAllowed=y%0Ahttps://antigo.mdr.gov.br/saneamento/proeesa/90)

Tamayo, V., Guevara, P., Cadena, S., Paz, E., Ruiz, V., & Zambrano, A. (2022). Genes involucrados con resistencia antimicrobiana en hospitales del Ecuador. *Revista Médica Científica CAMbios*, 1–7.

Ugarte, G. R., Olivo, J. M., Corso, A., Pasteran, F., Albornoz, E., & Sahuanay, Z. (2018). Resistencia a colistín mediado por el gen *mcr-1* identificado en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Primeros reportes en el Perú Resistance to colistin mediated by the *mcr-1* gene identified in strains of *Escherichia*. *An. Fac. Med.*, 79(3), 213–217.

Varela, M. F., Stephen, J., Lekshmi, M., Ojha, M., Wenzel, N., Sanford, L. M., Hernandez, A. J., Parvathi, A., & Kumar, S. H. (2021). Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10050593>

Villacís, J., Reyes, J., Castelán-Sánchez, H. G., Dávila-Ramos, S., Lazo, M. A., Wali, A., Boderó, L. A., Toapanta, Y., Naranjo, C., Montero, L., Campos, J., Galas, M. G., & Gestal, M. C. (2020). OXA-48 Carbapenemase in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 307 in Ecuador. *Microorganisms*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8030435>

Vinueza-Burgos, C., Ortega-Paredes, D., Narvaéz, C., De Zutter, L., & Zurita, J. (2019). Characterization of cefotaxime resistant *Escherichia coli* isolated from broiler farms in Ecuador. *PLoS ONE*, 14(4), 1–14.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207567>

Vinueza, D., Ochoa-Herrera, V., Maurice, L., Tamayo, E., Mejía, L., Tejera, E., & Machado, A. (2021). Determining the microbial and chemical contamination in Ecuador's main rivers. *Scientific Reports* 2021 11:1, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96926-z>

Wang, D., Zou, H., Zhao, L., Li, Q., Meng, M., Li, X., & Berglund, B. (2023). High prevalence of *Escherichia coli* co-harboring conjugative plasmids with colistin- and carbapenem resistance genes in a wastewater treatment plant in China. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 250, 114159. <https://doi.org/10.1016/J.IJHEH.2023.114159>

White, A., & Hughes, J. M. (2019). Critical Importance of a *One Health* Approach to Antimicrobial Resistance. *EcoHealth*, 16(3), 404–409. <https://doi.org/10.1007/s10393-019-01415-5>

WHO. (2019). *UN-Water Global Analysis and Assessment of Sanitation and Drinking-Water (GLAAS) 2019 report National systems to support drinking-water, sanitation and hygiene - Global status report 2019*.

World Health Organization. (2019). *Critically Important Antimicrobials for Human Medicine* (6th ed.). www.cdc.gov/DrugResistance/Biggest-Threats.html

World Health Organization. (2022). *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report 2022*. World Health Organization. <https://www.who.int/initiatives/glass>

Xiao, X., Zeng, F., Li, R., Liu, Y., & Wang, Z. (2022). Subinhibitory Concentration of Colistin Promotes the Conjugation Frequencies of *mcr-1*- and *bla*_{NDM-5}-Positive Plasmids. *Microbiology Spectrum*, 10(2). <https://doi.org/10.1128/spectrum.02160-21>

Zambrano Mero, J. D., Delgado Párraga, A. G., Zambrano Mero, E. T., & Peñaherrera Villafuerte, S. L. (2022). Contaminantes biológicos presentes en fuentes de agua del centro-sur de la provincia de Manabí, Ecuador. *Siembra*, 9(2), e4011. <https://doi.org/10.29166/siembra.v9i2.4011>

- Zapata, D., Oleas, N. H., Páez-Vacas, M., & Tobes, I. (2021). Water quality assessment of the cutuchi river basin (Ecuador): A review of technical documents. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 690(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/690/1/012058>
- Zhang, W., Zhang, T., Wang, C., Liang, G., Lu, Q., Wen, G., Guo, Y., Cheng, Y., Wang, Z., Shao, H., & Luo, Q. (2022). Prevalence of colistin resistance gene *mcr-1* in *Escherichia coli* isolated from chickens in central China, 2014 to 2019. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 29, 241–246. <https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2022.03.024>
- Zhou, Y. F., Liu, P., Zhang, C. J., Liao, X. P., Sun, J., & Liu, Y. H. (2020). Colistin Combined With Tigecycline: A Promising Alternative Strategy to Combat *Escherichia coli* Harboring *bla_{NDM-5}* and *mcr-1*. *Frontiers in Microbiology*, 10(January), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02957>
- Zhu, L., Shuai, X. Y., Lin, Z. J., Sun, Y. J., Zhou, Z. C., Meng, L. X., Zhu, Y. G., & Chen, H. (2022). Landscape of genes in hospital wastewater breaking through the defense line of last-resort antibiotics. *Water Research*, 209, 117907. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2021.117907>

ANEXOS

Anexo 1. Codificación de los aislamientos y los resultados de las pruebas de identificación de *E. coli*.

Número	Código	Punto de Origen	TSI	LIA	Citrato	Indol	Rojo de Metilo	Urea	MacConkey	Observaciones
1-A	A-C1-1	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
2-A	A-C1-2	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
3-A	A-C1-3	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
2-A	A-C1-4	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
5-A	A-C1-5	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
6-A	A-C2-1	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
7-A	A-C2-2	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
8-A	A-C2-3	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
9-A	A-C2-4	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
10-A	A-C2-5	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
11-A	A-C3-1	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
12-A	A-C3-2	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
13-A	A-C3-3	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
14-A	A-C3-4	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
15-A	A-C3-5	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/A H ₂ S-	-	-	+	-	Lac (+)	<i>Buttiauxella izardii</i>
16-A	A-C4-1	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
17-A	A-C4-2	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>

18-A	A-C4-3	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
19-A	A-C4-4	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
20-A	A-C5-1	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
21-A	A-C5-2	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
22-A	A-C5-3	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
23-A	A-C5-4	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
24-A	A-C5-5	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
25-A	A-C6-1	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
26-A	A-C6-2	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
27-A	A-C6-3	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
28-A	A-C6-4	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
29-A	A-C6-5	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
30-A	A-C7-1	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
31-A	A-C7-2	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
32-A	A-C7-3	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
33-A	A-C7-4	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
34-A	A-C7-5	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
35-A	A-T1-1	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
36-A	A-T1-2	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
37-A	A-T2-1	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
38-A	A-T2-2	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
39-A	A-T2-3	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>

40-4	A-T3-1	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
41-A	A-T3-2	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
42-A	A-T3-3	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
43-A	A-T3-4	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	+	+	+	-	Lac (+)	<i>Kluyvera ascorbata</i>
44-A	A-T3-5	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
45-A	A-T3-6	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
46-A	A-T3-7	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
47-A	A-T5-1	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
48-A	A-T5-2	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
49-A	A-T7-1	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
50-A	A-T7-2	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
51-A	A-T7-3	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
52-A	A-T7-2	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
53-A	A-T7-1	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
54-A	A-T6-1	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
55-A	A-T6-2	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
56-A	CR-PA3	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
57-A	CR-PA3	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
58-A	CR-PA3	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
59-A	CR-PA3	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
60-A	CR-PA3	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
61A	CR-PZ2	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>

62-A	CR-PZ2	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
53-A	CR-PZ2	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
54-A	CR-PZ2	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
65-A	CR-PZ2	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
66-A	CR-PA3	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
67-A	CR-PA3	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
68-A	CR-PA3	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
69-A	CR-PA3	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
70-A	CR-PA3	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
71-A	CR-PZ2	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
72-A	CR-PZ2	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
73-A	CR-PZ2	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
74-A	CR-PZ2	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
75-A	CR-PZ2	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
76-A	CR-PA3	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
77-A	CR-PA3	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
78-A	CR-PA3	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
79-A	CR-PA3	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
80-A	CR-PZ2	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
81-A	CR-PZ2	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
82-A	CR-PA3	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
83-A	CR-PZ2	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>

84-A	CR.PA3	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
85-A	CR.PZ2	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
86-A	CR.PZ2	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
87-A	CR.PZ2	Canal L-S-A	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
88	P-RC-PV6	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
89	P-RC-PV6	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
90	P-RC-PV6	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
91	P-RC-PV6	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
92	P-RC-PV6	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
93	S-RC-PA5	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
94	S-RC-PA5	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
95	S-RC-PA5	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
96	S-RC-PA5	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
97	S-RC-PA5	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
98	P-RC- PM7	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
99	P-RC- PM7	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
100	P-RC- PM7	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
101	P-RC- PM7	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/A H ₂ S-	+	-	+	-	Lac (+)	<i>Buttiauxella izardii</i>
102	P-RC- PM7	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
103	R-RC-PE4	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>

104	R-RC-PE4	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
105	R-RC-PE4	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
106	R-RC-PE4	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
107	R-RC-PE4	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
108	L-RC-PL2	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
109	L-RC-PL2	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
110	L-RC-PL2	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
111	L-RC-PL2	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
112	L-RC-PL2	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
113	L-RC-PR3	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
114	L-RC-PR3	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
115	L-RC-PR3	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
116	L-RC-PR3	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
117	L-RC-PR3	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
118	P-RC- PM7	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
119	P-RC- PM7	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
120	P-RC- PM7	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
121	P-RC- PM7	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
122	P-RC- PM7	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
123	P-RC-PV6	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>

124	P-RC-PV6	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
125	P-RC-PV6	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
126	P-RC-PV6	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
127	P-RC-PV6	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
128	S-RC-PA5	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
129	S-RC-PA5	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
130	S-RC-PA5	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
131	S-RC-PA5	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
132	S-RC-PA5	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
133	R-RC-PE4	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
134	R-RC-PE4	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
135	R-RC-PE4	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
136	R-RC-PE4	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
137	R-RC-PE4	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
138	S-RC-PA5	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
139	S-RC-PA5	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
140	S-RC-PA5	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
141	S-RC-PA5	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
142	S-RC-PA5	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
143	R-RC-PE4	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
144	R-RC-PE4	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
145	R-RC-PE4	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>

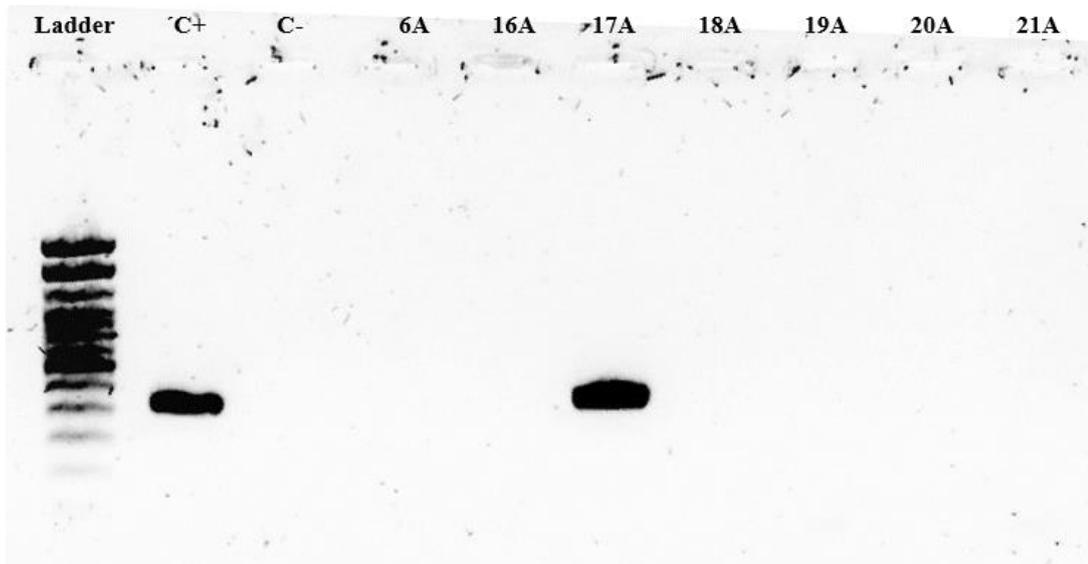
146	R-RC-PE4	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
147	R-RC-PE4	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
148	L-RC-PR3	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
149	L-RC-PR3	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
150	L-RC-PR3	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
151	L-RC-PR3	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
152	L-RC-PL2	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
153	P-RC- PM7	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
154	P-RC- PM7	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
155	P-RC- PM7	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
156	P-RC-PV6	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
157	P-RC-PV6	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
158	P-RC-PV6	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
159	P-RC-PV6	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
160	P-RC-PV6	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
161	S-RC-PA5	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
162	S-RC-PA5	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
163	S-RC-PA5	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
164	S-RC-PA5	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
165	S-RC-PA5	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
166	R-RC-PE4	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>

167	R-RC-PE4	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
168	R-RC-PE4	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
169	R-RC-PE4	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
170	L-RC-PR3	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
171	L-RC-PR3	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
172	L-RC-PR3	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
173	L-RC-PR3	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
174	L-RC-PR3	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
175	L-RC-PL2	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
176	L-RC-PL2	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
177	L-RC-PL2	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
178	P.RC.PV6	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
179	P.RC.PV6	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
180	P.RC.PV6	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
181	P.RC.PM7	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
182	P.RC.PM7	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
183	S.RC.PA5	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
184	S.RC.PA5	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
185	S.RC.PA5	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
186	L.RC.PE4	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
187	L.RC.PR3	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
188	L.RC.PL2	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>

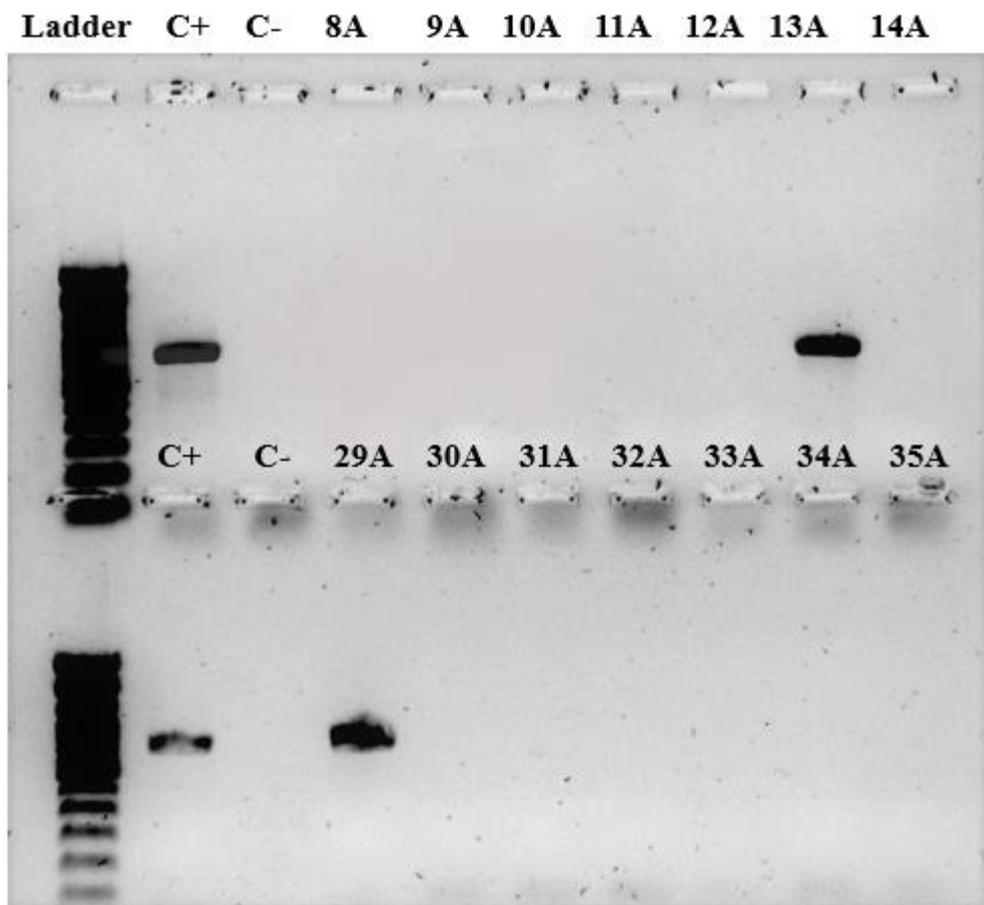
189	L.RC.PR3	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
190	P.RC.PM7	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
191	P.RC.PM7	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
192	P.RC.PM7	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
193	P.RC.PV6	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
194	P.RC.PV6	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
195	L.RC.PE4	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
196	L.RC.PE4	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
197	L.RC.PE4	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
198	S.RC.PA5	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
199	S.RC.PA5	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
200	S.RC.PA5	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
201	L.RC.PR3	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
202	L.RC.PR3	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>
203	L.RC.PR3	Río Cutuchi	A/A H ₂ S-	K/K H ₂ S-	-	+	+	-	Lac (+)	<i>E. coli</i>

Nota: Del total, tres aislados se identificaron que no correspondían a *E. coli* en función de las pruebas de identificación. De acuerdo con el programa ABIS se resalta el posible género y especie al que pertenece cada aislamiento. **TSI:** A/A H₂S- (producción de ácido sin producción de sulfuros con liberación de CO₂); **LIA:** K/K H₂S- (Alcalinización sin producción de sulfuros y liberación de CO₂); **Citrato:** (-) no consume citrato como fuente de carbono; **Indol:** (+) presencia de la enzima triptofanasa.

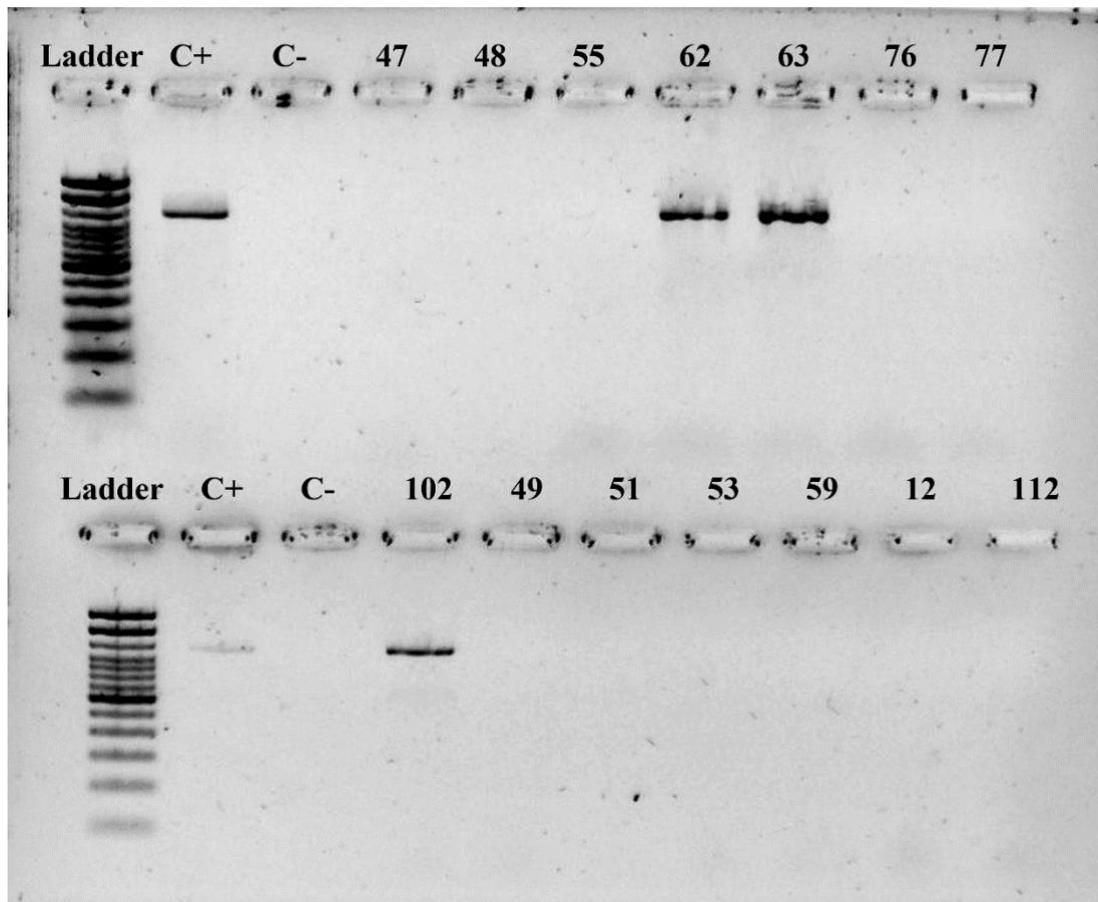
Anexo 2. Gel de electroforesis con muestras positivas para el gen bla_{OXA-48}.



Anexo 3. Gel de electroforesis con muestras positivas para el gen bla_{SHV}.



Anexo 4. Gel de electroforesis con muestras positivas para el gen *mcr-1*.



Anexo 5. Aislamientos positivos para los genes de resistencia a colistina, β -lactámicos y carbapenémicos.

Gen	Número	Código	Bacteria	Lugar
<i>mcr-1</i>	62	L.RC.PR3	<i>E. coli</i>	Río Cutuchi
	63	L.RC.PR3	<i>E. coli</i>	Río Cutuchi
	102	L.RC.PR3	<i>E. coli</i>	Río Cutuchi
<i>SHV</i>	13A	A-C3-3	<i>E. coli</i>	Canal L-S-A
	29A	A-C6-5	<i>E. coli</i>	Canal L-S-A
<i>OXA-48</i>	17A	A-C4-2	<i>E. coli</i>	Canal L-S-A

Anexo 6. Perfil de resistencia de los aislamientos ambientales en relación con el gen identificado.

Familia de Antibióticos	Cepas Ambientales											
	<i>mcr-1</i>				<i>bla_{SHV}</i>				<i>bla_{OXA-48}</i>			
	R (%)	I (%)	SSD (%)	S (%)	R (%)	I (%)	SSD (%)	S (%)	R (%)	I (%)	SSD (%)	S (%)
Agentes combinados	0,0	0,0	50,0	50,0	25,0	25,0	25,0	25,0	100,0	0,0	0,0	0,0
β-lactámicos												
Aminoglucósidos	100,0	0,0	0,0	0,0	50,0	50,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
Cefalosporinas	100,0	0,0	0,0	0,0	87,5	0,0	12,5	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
Carbapenémicos	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	33,3	66,7	0,0	0,0
Quinolonas	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
Penicilinas	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
Sulfonamidas	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
Monobactámicos	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
Polimixinas	66,7	0,0	0,0	33,3	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0

Nota. El perfil de resistencia se determinó en función del gen de resistencia en estudio: *mcr-1* comprende los aislamientos 62,63 y 102; *bla_{SHV}* (13-A y 29-A); y *bla_{OXA-48}* (17-A).

Anexo 7. Perfil de resistencia de los aislamientos conjugados en relación con el gen identificado.

Familia de Antibióticos	Cepas Conjugadas											
	<i>mcr-1</i>				<i>bla_{SHV}</i>				<i>bla_{OXA-48}</i>			
	R (%)	I (%)	SSD (%)	S (%)	R (%)	I (%)	SSD (%)	S (%)	R (%)	I (%)	SSD (%)	S (%)
Agentes combinados β-lactámicos	0,0	0,0	16,7	83,3	0,0	0,0	25,0	75,0	0,0	0,0	0,0	100,0
Aminoglucósidos	16,7	0,0	0,0	83,3	0,0	0,0	0,0	100,0	50,0	0,0	0,0	50,0
Cefalosporinas	75,0	25,0	0,0	0,0	62,5	0,0	25,0	12,5	50,0	0,0	25,0	25,0
Carbapenémicos	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0
Quinolonas	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0
Penicilinas	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
Sulfonamidas	0,0	0,0	0,0	100,0	50,0	0,0	0,0	50,0	0,0	100,0	0,0	0,0
Monobactámicos	0,0	100,0	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0	50,0	100,0	0,0	0,0	0,0
Polimixinas	66,7	0,0	0,0	33,3	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0

Nota. El perfil de resistencia se determinó en función del gen de resistencia en estudio para los aislamientos conjugados: *mcr-1* (62-J53,63-J53 y 102-J53); *bla_{SHV}* (13A-J53 y 29A-J53); y *bla_{OXA-48}* (17A-J53).

