



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**  
*La Universidad Católica de Loja*

**ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA**

**TÍTULO DE MAGÍSTER EN ANÁLISIS BIOLÓGICO Y DIAGNÓSTICO DE  
LABORATORIO**

**Determinación del gen *mcr-1* en cepas de *Escherichia coli* resistentes a  
colistina aisladas de muestras clínicas y vegetales.**

**TRABAJO DE TITULACIÓN.**

**AUTORA:** Jiménez Cuenca, Carla Guisela, Lic.

**DIRECTORA:** Toledo Barriga, Zorayda Patricia, Mgtr.

**LOJA-ECUADOR**

**2018**



*Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>*

2018

## APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DE TITULACIÓN

Magister.

Zorayda Toledo Barriga.

**DOCENTE DE LA TITULACIÓN.**

De mi consideración:

El presente trabajo de investigación denominado: **Determinación del gen *mcr-1* en cepas de *Escherichia coli* resistentes a colistina aisladas de muestras clínicas y vegetales** realizado por **Carla Guisela Jiménez Cuenca** ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, noviembre del 2018.

f).....

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

" Yo **Carla Guisela Jiménez Cuenca** declaro ser autor (a) del presente trabajo de la Titulación **Determinación del gen *mcr-1* en cepas de *Escherichia coli* resistentes a colistina aisladas de muestras clínicas y vegetales**, siendo la Magister Zorayda Patricia Toledo Barriga director (a) del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además, la ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: "Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad"

f).....

Autor: Carla Guisela Jiménez Cuenca

Cédula: 1900642735

## **DEDICATORIA**

En primer lugar, quiero dedicar este trabajo a DIOS, por brindarme fortaleza y salud para concluir con esta tesis, y por ayudarme a satisfacer mis necesidades espirituales, intelectuales y materiales. Así mismo con dedicación especial a mi hija EMILY que quizá en este momento no entienda mis palabras, pero para cuando sea capaz quiero que te des cuenta de lo que significas para mí. Te agradezco por ayudarme a encontrar el lado dulce y no amargo de la vida. Eres la razón de que me levanta cada día esforzarme por el presente y el mañana eres mi principal motivación. A mis padres Klever y Edith, a mis hermanos María del Cisne y Eduardo que los quiero tanto y que siempre han estado pendientes de mí.

**Carla Guisela.**

## **AGRADECIMIENTO**

Quiero expresar mi agradecimiento a Dios quien es mi guía, a todas las personas que con su soporte científico y humano han colaborado en la realización de este trabajo de fin de titulación

Agradezco a las instituciones que han hecho posible la realización de este trabajo por la ayuda brindada a la Universidad Técnica Particular de Loja gracias por la ayuda depositada en mí.

Especialmente a mi director de tesis Mgtr. Zorayda Toledo Barriga, por la aceptada orientación, soporte y discusión crítica que ha permitido un buen trabajo y que la misma llegara a buen término.

A los miembros del tribunal Mgtr. Fernando Serrano y Mgtr. Janneth Simaluiza por su aporte científico en dicha investigación.

A mi familia por su comprensión y apoyo, en especial a mi hija EMILY quien ha estado a mi lado compartiendo mis alegrías y angustias, por su amor incondicional, por el estímulo para que me supere día a día. Esta tesis va dedicada a ella.

**Carla Guisela.**

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DE TITULACIÓN.....	i
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
<b>CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>5</b>
1.1. Bacilos gram negativos.....	6
<b>1.1.1. <i>Escherichia coli</i>.....</b>	<b>7</b>
1.1.1.1. <i>Grupo taxonómico</i> .....	7
1.1.1.2. <i>Características</i> .....	7
1.1.1.3. <i>Clasificación</i> .....	7
1.1.1.3.1. <i>Cepas comensales</i> .....	8
1.1.1.3.2. <i>Patotipos Intestinales patógenos</i> .....	8
1.1.1.3.2.1. <i>Escherichia coli extraintestinales (ExPEC)</i> .....	8
1.1.1.3.2.2. <i>Escherichia coli uropatógena (UPEC)</i> .....	9
1.2. Antibióticos.....	9
1.2.1. Antibióticos betalactámicos.....	10
1.2.2. Polimixinas.....	10
1.3. Resistencia bacteriana.....	10
1.3.1. Resistencia natural.....	10
1.3.2. Resistencia adquirida.....	11
1.3.3. Mecanismos de resistencia.....	11
1.3.3.1. <i>Trastornos de permeabilidad</i> .....	11
1.3.3.2. <i>Modificación del sitio blanco de acción</i> .....	11
1.3.3.3. <i>Hidrolisis enzimática</i> .....	11
1.4. Resistencia a la colistina.....	12
1.5. Epidemiología del gen <i>mcr- 1</i> .....	12

1.6. Metodología de identificación molecular del gen <i>mcr-1</i> .....	14
<b>CAPÍTULO II. OBJETIVOS</b> .....	16
2.1. Objetivo general. ....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
<b>CAPÍTULO III. MÉTODOS</b> .....	18
3.1. Muestreo. ....	19
3.2. Selección de cepas resistentes a colistina.....	19
3.2.1. Método de difusión en agar. ....	19
3.2.2. Dilución en agar (Agar MacConkey suplementado con colistina al 2mg/ml)....	19
3.3. Identificación molecular del gen <i>mcr-1</i> .....	20
3.3.1. Extracción de ADN.....	20
3.3.2. Reacción en cadena de polimerasa (PCR). ....	20
3.4. Análisis estadístico. ....	21
<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	22
4.1. Selección de cepas resistentes a colistina.....	23
4.2. Identificación molecular del gen.....	24
4.3 Discusión.....	24
<b>CONCLUSIONES</b> .....	27
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	28
<b>BIBLIOGRAFIA:</b> .....	29

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Aislamiento de cepas de E. coli en agar MacConkey con colistina (2mg/l). Positivo: se observa crecimiento de colonias bacterianas. Negativo: ausencia de crecimiento de colonias. 20

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Cebador y Condiciones de la PCR.....20

**Tabla 2.** Porcentaje de cepas resistentes a colistina mediante método de difusión en disco. ...23

**Tabla 3.** Porcentaje de cepas resistentes a colistina mediante método de difusión en disco dependiendo del origen de la muestra. ....23

**Tabla 4.** Porcentaje de cepas resistentes a colistina mediante método de dilución. ....23

## ABREVIATURAS

**E. coli:** *Escherichia coli*

**gmcr-1:** gen *mcr-1*

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**BLEE:** Betalactamasas de espectro extendido

**DAEC:** *Escherichia coli* difusamente adherente

**DEC:** *Escherichia coli* diarrogénica

**EAEC:** *Escherichia coli* enteroagregativa

**EIEC:** *Escherichia coli* enteroinvasiva

**EPEC:** *Escherichia coli* enteropatógena

**ETEC:** *Escherichia coli* enterotoxigénica

**ExPEC:** *Escherichia coli* patógena extraintestinal

**IESS:** Instituto de seguridad social.

**ITU:** Infecciones del tracto urinario

**MNEC:** *Escherichia coli* causante de meningitis o septicemias

**PCR:** Reacción en cadena de polimerasa

**UFC:** Unidades formadoras de colonia

**g:** gramo

**ETA:** enfermedades producidas por alimentos

**°C:** grados celcius

**VLC:** vegetales listos para el consumo

**C:** colistina

**MH:** Mueller Hinton

**ACL:** Agar con colistina líquida

**MacConkey:** Agar MacConkey

## RESUMEN

La resistencia de los gérmenes a los antimicrobianos se produce cuando los microorganismos, sufren cambios que hacen que los medicamentos para curar infecciones dejen de ser eficaces. Las betalactamasas es uno de los principales mecanismos de resistencia bacteriana. La colistina utilizada como terapia de última línea para tratar infecciones por bacilos gram negativos resistentes, fármaco de estrecho margen terapéutico, que requiere un balance entre las concentraciones, en sitio de acción para lograr la eficacia terapéutica minimizando la emergencia de resistencia y al mismo tiempo evitar su toxicidad. El presente trabajo tiene como objetivo determinar la presencia del gen *mcr-1* en cepas de *Escherichia coli* resistentes a colistina en muestras clínicas y de alimentos. Los métodos utilizados fueron difusión en disco y dilución en agar obteniendo 19,60% y 52,33%, evidenciando una diferencia del 32.73%. En nuestro estudio no se evidencio la presencia del gen *mcr-1*, puede ser que se encuentre asociada a otros genes que confieran resistencia cromosómica o a otras variantes del *mcr-1* como *mcr-2* a *mcr-8*.

**Palabras claves:** *Escherichia coli*, resistencia gen *mcr-1*, colistina.

## ABSTRACT

The resistance of germs to antimicrobials occurs when microorganisms undergo changes that make medicines to cure infections no longer effective. Beta-lactamases is one of the main mechanisms of bacterial resistance. Colistin used as a last-line therapy to treat infections with resistant gram-negative bacilli, a drug with narrow therapeutic margin, which requires a balance between concentrations, in place of action to achieve therapeutic efficacy, minimizing the emergence of resistance and at the same time avoiding its toxicity The objective of this work is to determine the presence of the *mcr-1* gene in strains of *Escherichia coli* resistant to colistin in clinical and food samples. The methods used were disk diffusion and agar dilution, obtaining 19.60% and 52.33%, evidencing a difference of 32.73%. In our study the presence of the *mcr-1* gene was not evidenced, it may be associated with other genes that confer chromosomal resistance or other variants of *mcr-1* such as *mcr-2* to *mcr-8*.

**KEYWORDS:** *Escherichia coli*, resistance gen *mcr-1*, colistin.

## INTRODUCCIÓN

La resistencia actual de los gérmenes a los antimicrobianos constituye un grave problema actual de salud que se produce cuando los medicamentos utilizados para curar infecciones dejan de ser eficaces. Ya que los antimicrobianos son medicamentos utilizados para prevenir en algunos casos, tratar infecciones bacterianas y otros agentes biológicos. La resistencia a los antibióticos ocurre cuando se producen mutaciones en las bacterias como respuesta al uso continuado de fármacos (Serra, 2017). *Escherichia coli* es un habitante normal de los intestinos de la mayoría de animales, incluido los humanos. Algunas cepas de *E. coli* pueden causar una amplia variedad de enfermedades intestinales y extraintestinales (Clermont, Bonacorsi, Bingen, & Bonacorsi, 2000). En los últimos años se ha descrito un incremento en el aislamiento de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Las betalactamasas es uno de los principales mecanismos de resistencia bacteriana. Además, son enzimas capaces de inactivar los antibióticos de la familia betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos). Se han descrito con mayor frecuencia en cepas de *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*, las betalactamasas de espectro extendido pueden ser producidas por cualquiera de las enterobacterias, incluso de los bacilos no fermentadores *P. aeruginosa* y *A. baumannii* (Morejón, 2013). Estas enzimas confieren resistencia a un gran número de antibióticos de uso común como: penicilina, ampicilina, cefalosporinas de cualquier generación (excepto cefamicinas) y en un porcentaje bajo de casos también a los betalactámicos asociados a los inhibidores de betalactamasas, aminoglucósidos, tetraciclina y cotrimaxol. El patrón de multiresistencia supone una dificultad terapéutica, que explica su asociación en numerosos estudios con mayor mortalidad, duración de la estancia hospitalaria y costo económico (García et al., 2011).

Debido a este problema la colistina fue reintroducida como terapia de última línea para tratar las infecciones causadas por bacilos gram negativos resistentes, es un fármaco utilizado de estrecho margen terapéutico, por lo que requiere mantener un balance entre las concentraciones necesarias en sitio de acción para lograr la eficacia terapéutica minimizando la emergencia de resistencia y al mismo tiempo evitar su toxicidad (Medina, Paciel, Noceti, & Rieppi, 2017). En noviembre del 2015 en China investigadores demostraron que se ha encontrado un nuevo gen *mcr-1* descubierto en una cepa de *E. coli* (SHP45) en un cerdo que confiere resistencia a polipéptidos, por un mecanismo transferible. Este gen fue encontrado con más frecuencia en *E. coli*, pero también *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella spp*, estos aislamientos provenían

principalmente de muestras de animales para consumo y alimentos, y en menor medida se lo encontró en muestras de origen humano. Además, existen estudios realizados con el gen *mcr-1* en diferentes tipos de muestras y en los siguientes países: Canadá en el 2015, Brasil, Ecuador, Argentina, Colombia, EEUU en el 2016. El gen *mcr-1* se encuentra en los plásmidos, por lo que las bacterias pueden compartir y diseminar fácilmente la resistencia a otras bacterias (OPS & OMS, 2016).

Por ello hemos creído conveniente realizar el presente estudio con el objetivo de determinar la presencia del gen *mcr-1* en cepas de *Escherichia coli* resistentes a la colistina en muestras clínicas y de alimentos.

## **CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO**

## 1.1. Bacilos gram negativos.

En el año de 1844 el bacteriólogo danés Hans Christian Joachim Gramen, desarrolló una coloración denominada Tinción de Gram empleada en microbiología para la observación de bacterias, las gram positivas se tiñen de color violeta y las gram negativas de color rosa. El término bacilo, bacteria en forma de barra o vara, y puede encontrarse en muchos grupos taxonómicos diferentes a las bacteriana. Los bacilos gram negativos, no fijan el violeta de genciana porque poseen la capa de lipopolisacárido (peptidoglicano) (Mustos et al., 2013).

Los bacilos gram negativos no exigentes incluye diferentes familias y géneros muchos de ellos muy frecuentes en patología médica. Comparten algunas características tales como poseer en su pared externa un lipopolisacárido (LPS), que les otorga características patogénicas particulares, tóxicas, la llamada endotoxina de las bacterias gram negativas, muchos de ellos son ubicuos, encontrándose muy difundidos entre los animales y la naturaleza, pudiendo causar enfermedad en el hombre y los animales como es el caso de *Salmonella*; otros, aunque bien adaptados al medio ambiente son patógenos humanos exclusivos por ejemplo *Vibrio cholerae* por último otros se encuentran bien adaptados a su huésped, como, por ejemplo, *Shigella*. Algunos de estos bacilos gram negativos poseen atributos de virulencia bien definidos, comportándose como patógenos primarios, *Yersinia pestis*, *Salmonella typhi*, responsables de la Peste y la Fiebre Tifoidea respectivamente. Otros tales como *Acinetobacter* y *Pseudomonas* producen infecciones oportunistas. Algunos de ellos como *Escherichia coli* forman parte de la flora normal del tubo digestivo y permanecen en él sin causar enfermedad siempre y cuando no se modifiquen las condiciones de su hábitat.

Se ha asociado a cepas de *Enterobacteriaceae* con abscesos, neumonías, meningitis, septicemia, infecciones de heridas, infecciones urinarias e intestinales. Son el componente mayor de la flora normal intestinal, pero son relativamente poco frecuentes en otros sitios del organismo. Algunas especies son importantes como causa de infecciones nosocomiales. Significan el 50% de todos los aislamientos clínicos y el 80% de los bacilos gram negativos. Representan el 50% de los casos de septicemia y más del 70% de las infecciones urinarias. Hasta 1940 sólo *Salmonella* y *Shigella* estaban relacionadas con gastroenteritis humana. Actualmente es bien conocido algunas variantes patogénicas de *E. coli* como causa significativa de enfermedad diarreica y cepas invasivas de *Yersinia enterocolitica* como causa de diarrea y adenitis mesentérica. Clásicamente se han descrito a las especies no relacionadas con enfermedad diarreica, como agentes de infecciones oportunistas, capaces de producir enfermedad en el

hospedero inmunocomprometido o por transposición de flora. Por otra parte, salvo *Shigella* que raramente causa infecciones fuera del tracto gastrointestinal muchas especies de *Enterobacteriaceae* causan frecuentemente infecciones extraintestinales (López, Torres, & Prada, 2016) .

### **1.1.1. *Escherichia coli*.**

*Escherichia coli* descrita por primera vez en 1885 por Theodore von Escherich, bacteriólogo alemán, quien la denominó *Bacterium coli*. Es una especie diversa, es parte de la microbiota intestinal de humanos y animales. En algunas ocasiones estas cepas son responsables de causar enfermedades extraintestinales tales como: infecciones del tracto urinario, meningitis neonata, septicemias entre otras, como también infecciones gastrointestinales como diarrea, colitis hemorrágica y síndrome urémico (Guillen, Millan, & Araque, 2014).

#### **1.1.1.1. Grupo taxonómico.**

<b>Reino</b>	Bacteria.
<b>Filo</b>	Proteo bacteria.
<b>Clase</b>	Gammaproteobacteria.
<b>Orden</b>	Enterobacteriales.
<b>Familia</b>	Enterobacteriaceae.
<b>Genero</b>	<i>Escherichia</i> .
<b>Especie</b>	<i>E. coli</i> (Márquez & Quiroz, Iliana, 2018).

#### **1.1.1.2. Características.**

Bacilo gram negativo, con una sola cadena espiral de ADN móvil, anaerobio y aerobio facultativo, con flagelos peritricos. Contiene información genética almacenada en los plásmidos responsables de producción de toxinas, contienen alrededor de 5000 genes (Franco, Ramirez, Orozco, & Lopez, 2013).

#### **1.1.1.3. Clasificación.**

Se clasifica en tres principales grupos teniendo en cuenta el tipo de infección que provocan como:

#### **1.1.1.3.1. Cepas comensales.**

*E. coli* se encuentra en materias fecales del ser humano y de algunas especies animales: conviven con el huésped en estado normal, sin causar enfermedad, siendo un importante mecanismo de defensa que ayuda en la contribución al desarrollo de repuestas inmunológicas (Brooks, Butel, & Morse, 2011).

#### **1.1.1.3.2. Patotipos Intestinales patógenos.**

Los patotipos de *E. coli* diarrogénica (DEC), bacterias que colonizan el intestino de los seres humanos, transmitiendo directamente de: persona a persona, animal a persona o indirectamente a través de alimentos contaminados mediante el agua. Se dividen en seis patotipos como: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* productora de Toxina Shiga (STEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* difusamente adherente (DAEC) (Brooks et al., 2011).

Análisis moleculares demostraron que *E. coli* concierne a cuatro grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D): *chuaA* gen requerido para transporte de hemoglobina en *E. coli*. El gen *yjaA* identificado en la secuencia del genoma de *E. coli* K-12, función desconocida y un fragmento de ADN anónimo denominado *tspe4*.

Cepas de *E. coli* son genéticamente diversas y desde un punto de vista filogenético las pertenecientes a: grupo A y B1 de bajo poder virulento siendo cepas comensales, cepas ExPEC se derivan de los grupos B2 y D que tienen genes que codifican factores extraintestinales de virulencia (Millan, Hernandez, Millan, & Araqueu, 2014).

#### **1.1.1.3.2.1. Escherichia coli extraintestinales (ExPEC).**

Son *E. coli* no comensales que pueden causar enfermedades extraintestinales (López et al., 2016). La ExPEC es la causa más común de infecciones del aparato urinario y es responsable casi el 90% de infecciones de vías urinarias, algunos casos de pielonefritis e infecciones urinarias incorporadas con catéter. Las ExPEC pueden provocar bacteriemia con signos cíclicos de septicemia que, en ausencia oportuno de tratamiento puede causar incluso la muerte (Contreras, Riveros, Lluque, & Barletta, 2011).

Algunos genes de virulencia se han relacionado positivamente con la patogenicidad de ExPEC, exhiben una variedad considerable del genoma y posee una amplia gama de factores asociados a virulencia, incluyen toxinas, adherencias, lipopolisacáridos, proteasas que con frecuencia están codificadas por islas patógenas y otras islas de ADN móviles. Estos factores de virulencia contribuyen a la competitividad de ExPEC y aumentan la adaptabilidad y la capacidad de colonizar el cuerpo humano en lugar de ser factores de virulencia típicos implicados en la infección (Farfán, Ariza, Vargas, & Vargas, 2016).

Además, causan infecciones extraintestinales en animales domésticos y mascotas, sugiriendo que los organismos son patógenos zoonótico. Los genes para múltiples factores de virulencia a menudo están presentes juntos en grandes bloques de ADN cromosómico, llamados “islas asociadas a la patogenicidad” (PAI), que son similares pero distintos a los PAI incorporados a la diarrea que están presentes en muchos *E. coli* intestinales patógenos (Marchese, 2016). Existen además algunas infecciones fuera del sistema gastrointestinal tales como: *E. coli* uropatógeno (UPEC) y *E. coli* causante de meningitis y/o septicemias (MNEC).

#### **1.1.1.3.2.2. *Escherichia coli* uropatógena (UPEC).**

UPEC es la principal causa de infecciones urinarias, responsable del 75-85% de este tipo de enfermedad (Celis, 2012); el reservorio de UPEC es el tracto intestinal humano y usa una recopilación de varios factores de virulencia para colonizar e infectar el tracto urinario, también se han descrito brotes clónicos de infecciones del tracto urinario (UTI) debido al consumo de alimentos contaminados con UPEC (Tuco-succhil et al., 2014).

## **1.2. Antibióticos.**

Sustancias producidas por diversas especies de microorganismos como: bacterias, hongos, actinomices, que suprimen el crecimiento de otros microorganismos y eventualmente pueden arruinarlos (Marrero, Toppes, & Castellanos, 2015).

Los antibióticos pueden clasificarse por: su estructura, su efecto antimicrobiano; bacteriostáticos y bactericidas, espectro de acción mecanismo de acción; amplio, intermedio y espectro reducido, por su mecanismo de acción por el cual un antibiótico es capaz de inhibir el crecimiento o destruir una célula bacteriana que se dividen en inhibidores de la formación de la pared bacteriana, inhibidores de la síntesis proteica, inhibidores de la duplicación del ADN, inhibidores de la

membrana citoplasmática, inhibidores de vías metabólicas (Monclús, Ocejo, Sánchez, & Romero, 2015).

### **1.2.1. Antibióticos betalactámicos.**

Amplia clase de antibióticos con actividad dependiente del tiempo que tienen buena distribución y escasa toxicidad (Morejón, 2013). Agente antibiótico que contiene un anillo  $\beta$ -lactámico en su estructura molecular. Tienen la función de inhibir la síntesis del peptidoglicano mediante bloqueo en la última etapa de producción; también activa la autolisina bacteriana endógena (Alvarez et al., 2015)

### **1.2.2. Polimixinas.**

La polimixina es un antibiótico polipeptídico, producida por una cepa de *Bacillus polymyxa*. Se destinan con letras A, B, C, D y E, solo la polimixina B y la polimixina E o colistina ha surgido como último recurso frente a infecciones patógenas están disponibles para uso clínico. Su espectro de actividad se limita a las bacterias gram negativas: *E. coli*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp* y especialmente *Pseudomonas aeruginosa*. Actúa a nivel de la membrana celular bacteriana altera la permeabilidad y el metabolismo, lo que provoca la muerte por lisis celular. Escasamente absorbida por vía oral, desarrolla una acción local o in situ que se beneficia para tratamiento de infecciones gastrointestinales asociadas con sustancias astringentes o antidiarreicas (Osorio et al., 2017).

El aumento de su uso conlleva a la emergencia de resistencia, encontrándonos frente a una situación potencialmente catastrófica, en particular dada la recientemente descrita presencia de plásmidos transferibles entre especies conteniendo genes que confieren resistencia a colistina (gen *mcr-1*) (Aguayo et al., 2016).

## **1.3. Resistencia bacteriana.**

La resistencia actual de los gérmenes a los antimicrobianos constituye un grave problema de salud que se produce cuando los medicamentos utilizados para curar infecciones dejan de ser eficaces. Ya que los antimicrobianos son medicamentos utilizados para prevenir o para tratar infecciones bacterianas y otros agentes biológicos. Existe resistencia cuando ocurren mutaciones en los mismos en respuesta al uso continuado de fármacos (Farfán et al., 2016).

### **1.3.1. Resistencia natural.**

Cepas de una misma familia, especie o grupo bacteriano, siendo un mecanismo permanente genéticamente y sin correlación con la dosis de antibiótico (Farfán et al., 2016).

### **1.3.2. Resistencia adquirida.**

Características propias de una especie bacteriana, que por naturaleza es sensible a un antibiótico que ha sido modificada por mutaciones o por adquisición de genes de resistencia (plásmidos, transposones e integrones) (Farfán et al., 2016).

### **1.3.3. Mecanismos de resistencia.**

La resistencia natural o adquirida se puede exhibir desde el punto de vista bioquímico o molecular integrándose en tres componentes básicos como: trastornos de permeabilidad, modificación del sitio blanco de acción, hidrólisis enzimática (Fica, 2014).

#### **1.3.3.1. *Trastornos de permeabilidad***

Se deben a cambios que se dan en los receptores bacterianos específicos para antimicrobianos membrana/pared celular. Reducen la expresión de las porinas por su alto contenido de lípidos, presentando una membrana externa con un 40% de lipopolisacárido que provee una barrera efectiva contra la entrada de antibióticos, dependiendo de la composición química (Torres, 2012).

#### **1.3.3.2. *Modificación del sitio blanco de acción.***

Varios microorganismos debido a mutaciones cromosómicas o adquisición de genes exógenos logran presentar alteraciones en sitios de acción, ejemplo; las PBP (penicillin-binding proteins) o la DNA girasa que son dianas para betalactámicos y las quinolonas. Las modificaciones no impiden a las dianas seguir realizando su función en la bacteria, aunque disminuyen la afinidad de su unión con el antibiótico lo que hace que dicho microorganismo se haga resistente (Padgett et al., 2011).

#### **1.3.3.3. *Hidrolisis enzimática.***

Es la inactivación de los betalactámicos como resultado de la acción de las enzimas betalactamasas, hidrolizan el núcleo betalactámico rompiendo enlace de amida. Además, existen factores de riesgo asociados con infecciones producidas por bacterias como *E. coli* creadora de betalactamasas de espectro extendido como: infecciones urinarias recurrentes, patología renal

subyacente, antibióticos previos que incluyen, hospitalización previa, diabetes mellitus, patología hepática subyacente (Casellas, 2011).

#### **1.4. Resistencia a la colistina.**

La emergencia de resistencia a la colistina/polimixina es preocupante, ya que es considerado un tratamiento de última generación; para las bacterias con resistencia a múltiples antibióticos, como los productores de carbapenemasas, se ha detectado el gen *mcr-1* que confiere resistencia a colistina/polimixina y que se encuentra en elementos genéticos móviles, las bacterias han adquirido la capacidad de compartir resistencia a las polimixinas extendiendo así la resistencia a otros organismos (Quizhpe et al., 2014).

#### **1.5. Epidemiología del gen *mcr-1*.**

La resistencia a los antimicrobianos es reconocida como una de las amenazas globales más graves para la salud humana en el siglo XXI, ahora hay evidencia de tracción política, con el respaldo de las declaraciones de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de la OMS y los EE. UU. Describen una crisis global y una catástrofe inminente de un retorno a la era preantibiótica tales como KPC-2 (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase-2*) y NDM-1 (New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1) (CDC, 2016). La necesidad clínica y la prevención de la resistencia se ven aún más comprometidas por el uso agrícola de antibióticos humanos, donde algunos países han usado activamente la colistina en la producción animal. La colistina pertenece a la familia de las polimixinas, los polipéptidos catiónicos, con actividad de amplio espectro contra las bacterias gram negativas, incluida la mayoría de especies de la familia enterobacterias. Las dos polimixinas actualmente en uso clínico son polimixina B y polimixina E (colistina), que difieren solo por un aminoácido entre sí y tienen una actividad biológica comparable.

En la actualidad, las polimixinas siguen siendo una de las últimas clases de antibióticos en las que no se sabe que la resistencia se propague de una célula a otra (mediada por plásmidos). Existen casos de un mecanismo de resistencia a la colistina mediada por plásmidos, denominado *mcr-1*. Se describe su mecanismo de acción y su aparición en Enterobacterias a partir de aislamientos animales y humanos, la propagación de *mcr-1* del sector veterinario a los seres humanos. El primer hallazgo fue en noviembre del 2015 en China donde se describió por primera vez la resistencia a colistina mediada por plásmidos causada por el gen *mcr-1*. Después de ese informe, las investigaciones retrospectivas de aislamientos históricos de los Estados Unidos han identificado la rara aparición de *mcr-1* en Enterobacterias a partir de la década de 1980. Las

bacterias con este mecanismo de resistencia ahora se han identificado a partir de humanos, alimentos, muestras ambientales y animales de alimentos en al menos 20 países de todo el mundo. La mayoría de estos informes hasta la fecha han identificado el gen *mcr-1* en *E. coli*, también se ha informado de especies de *Salmonella*, *Shigella sonnei* y *Klebsiella pneumoniae*. Se han identificado tres *E. coli* productoras de *mcr-1* en los Estados Unidos a partir del 7 de junio de 2016, una en espécimen clínico de una persona en Pennsylvania y dos de muestras intestinales de cerdos (Malbran, 2016).

El gen *mcr-1*, que codifica la resistencia transferible a colistina, se ha confirmado en comensales de *E. coli* de Italia, en la producción primaria de pavos. El primer aislado *mcr-1* positivo confirmado se encuentra entre los aislados resistentes a colistina detectados en el programa de monitoreo armonizado realizado en muestras fecales en el 2014, y destinado a estimar la prevalencia de resistencia a antimicrobianos en zoonosis mayores (ejemplo: *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*) y bacterias comensales indicadoras (ejemplo *E. coli*). Los aislamientos con concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) para la colistina por encima del límite epidemiológico ya se habían notificado a la Autoridad Nacional Competente y a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). El Laboratorio Nacional de Referencia para la Resistencia a los Antimicrobianos, Roma, Italia, ha estado investigando la base genética de la resistencia a la colistina (Cahuayme-Zuniga & Kontoyiannis, 2010).

El primer aislado con el gen *mcr-1* confirmado, fue secuenciado genoma completo en colaboración con el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para la Resistencia Antimicrobiana (EURL-AR), Universidad Técnica de Dinamarca (DTU). Se trataba de una secuencia multidrogo resistente (SMX, TMP, CIP, TET, CHL, COL, AMP).

En noviembre del 2015, un informe de China describió por primera vez la resistencia a colistina mediada por plásmidos causada por el gen *mcr-1*. Después de ese informe, las investigaciones retrospectivas de aislamientos históricos de los Estados Unidos han identificado la rara aparición de *mcr-1* en Enterobacterias a partir de la década de 1980. Las bacterias con este mecanismo de resistencia ahora se han identificado a partir de humanos, alimentos, muestras ambientales y animales de alimentos en al menos 20 países de todo el mundo. La mayoría de estos informes hasta la fecha han identificado el gen *mcr-1* en *E. coli*, también se ha informado de especies de *Salmonella*, *Shigella sonnei* y *Klebsiella pneumoniae*. Se han identificado tres *E. coli* productoras de *mcr-1* en los Estados Unidos a partir del 7 de junio de 2016, una en espécimen clínico de una persona en Pennsylvania y dos de muestras intestinales de cerdos. El aislado de una persona en Pennsylvania y dos de muestras intestinales de cerdo. El aislado de *E. coli* del paciente

también fue resistente a los antibióticos en al menos 5 clases de 4 antibióticos adicionales, que incluyen cefalosporinas, fluroquinolonas, sulfonamidas, aminoglucósidos y tetraciclinas. La muestra de un cerdo también fue resistente a otros antibióticos, incluyendo ampicilina, estreptomicina, sulfisoxazol y tetraciclina (Malbran, 2016).

En noviembre del 2012 y 2013 en muestras recolectadas en estudios recolectadas en turistas holandeses entre una y dos semanas después de haber retornado a su país detecto el gen *mcr-1* en 6 de 9 aislados de *E. coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) que presentan resistencia a colistina. Estos aislamientos corresponden a 6 viajeros, 2 de los cuales visitaron Colombia, Bolivia y Perú, otros 2 viajeros que visitaron China, 1 que visito Tunes y 1 que visito varios países en el sur este asiático (Tailandia). La duración de los viajes fue entre 8 y 40 días con una media de 21.3 días (OPS & OMS, 2016).

En diciembre del 2015 la agencia de Salud Pública de Canadá informa sobre el hallazgo del gen *mcr-1* en 3 muestras diferentes, una muestra aislada en pacientes de 62 años y 2 muestras aisladas en carne picada para la venta, Brasil en 2016 informan sobre hallazgos de *E. coli* productora del gen *mcr-1* en el país a partir de muestras de alimentos de animales, en el mismo se hace referencia a un aislamiento de *E. coli* portador del gen *mcr-1* procedente de muestra humana de Ecuador.

El Laboratorio Regional de referencia de la Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos en 2016, el servicio antimicrobiano INEI ANLIS “Dr. Carlos G. Malbran” de Buenos Aires, Argentina, confirmo la detección de cepas clínicas de *E. coli* portadoras del gen *mcr-1*, nueve pacientes ingresados. Los diferentes aislamientos que reportaban el gen *mcr-1* no tenían relación genética entre si y la resistencia detectada fue del tipo transferible, esto muestra que el mecanismo es capaz de ser diseminado de una bacteria a otra.

Además, en Colombia en 2016, informo sobre la detección del gen *mcr-1* en tres aislamientos de *Salmonella entérica serovar, Typhimurium* de pacientes procedentes de Antioquia, Bogotá y Boyacá; y un aislamiento de *E. coli* en una paciente de Santander.(OPS & OMS, 2016).

#### **1.6. Metodología de identificación molecular del gen *mcr-1*.**

El apoyo fundamental de las pruebas diagnósticas para patógenos bacterianos son los cultivos y susceptibilidad antimicrobiana. Las metodologías moleculares demuestran ser efectivas y sensibles. También existen pruebas como: reacción en cadena de polimerasa (PCR),

electroforesis en gel y secuenciación del genoma que permite trabajar con el ADN extraído de muestras clínicas de cultivos puros (Quizhpe et al., 2014).

## **CAPÍTULO II. OBJETIVOS**

## **2.1. Objetivo general.**

Determina la presencia del gen *mcr-1* en cepas de *Escherichia coli* resistentes a colistina.

## **2.2. Objetivos específicos.**

- Determinar fenotípicamente la resistencia a colistina mediante el método de difusión en placa.
- Determinar genotípicamente la presencia del gen *mcr-1* responsable de la resistencia a colistina.

## **CAPÍTULO III. MÉTODOS**

### **3.1. Muestreo.**

Se analizó 107 cepas de *Escherichia coli* aisladas de muestras provenientes de tracto urinario (80 muestras) de pacientes que acudieron al hospital Manuel Ignacio Monteros recolectadas durante julio-noviembre 2013 y de vegetales empacados y frescos (27 muestras) de los supermercados de la ciudad de Loja.

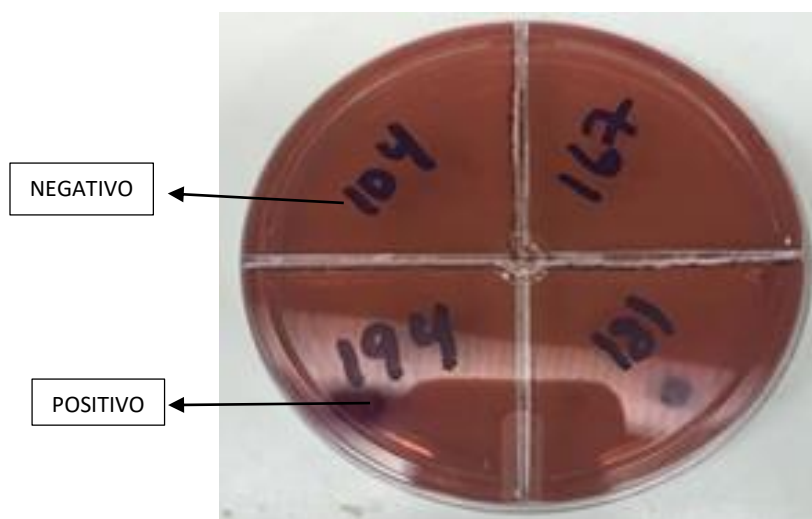
### **3.2. Selección de cepas resistentes a colistina**

#### **3.2.1. Método de difusión en agar.**

Se realizó el método de difusión en agar Mueller Hinton utilizando el antibiótico colistina (10ug) mediante la técnica de Kirby y Bauer con una turbidez del inóculo equivalente a 0,5 de la escala de McFarland, se incubó a una temperatura de  $35 \pm 2$  °C, durante 18 a 24 horas. Posteriormente se realizó la medición de zonas de inhibición, cuya interpretación fue la siguiente: sensible  $\geq 14$  mm; resistente  $\leq 10$ mm. Esta prueba hasta el momento no cuenta con puntos de corte, sin embargo, según estudios realizados por el Laboratorio Regional de referencia de la Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos aislamientos con halos  $\leq 10$  mm se asociaron con alta confianza con CIM en la categoría de resistentes, mientras que cepas con halos  $\geq 14$  mm se corresponden con una CIM sensible y cepas con halos entre 11-13 mm requieren definición por CIM.

#### **3.2.2. Dilución en agar (Agar MacConkey suplementado con colistina al 2mg/ml)**

Se inocularon las cepas de *E.coli* en una placa preparada de agar MacConkey suplementado con una concentración de 2 mg/L de colistina. Se consideró como indicativa de resistencia a la colistina, la cepa que creció en el medio de cultivo y negativa aquella que no creció (**Figura 1**).



**Figura 1.** Aislamiento de cepas de *E. coli* en agar MacConkey con colistina (2mg/l). Positivo: se observa crecimiento de colonias bacterianas. Negativo: ausencia de crecimiento de colonias.

**Fuente:** Autor  
**Elaboración:** Autor

### 3.3. Identificación molecular del gen *mcr-1*

#### 3.3.1. Extracción de ADN.

El ADN fue extraído con Wizard Genomic DNA Purification Kit Technical Manual, en base a protocolo específico para bacterias Gram negativas (Liu et al., 2016).

#### 3.3.2. Reacción en cadena de polimerasa (PCR).

Una vez extraído el ADN de las cepas de *E. coli* resistentes a colistina se realizó la amplificación con los cebadores CLR5-F y CLR5-R del gen *mcr-1* mediante PCR simple (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Cebador y Condiciones de la PCR

Nombre del cebador	Gen	Secuencia
CLR5 - F	<i>mcr-1</i>	CGGTCAGTCCGTTTGTTTC
CLR5- R		CTTGGTCGGTCTGTAGGG
Tamaño del amplicon		Ciclado

---

**309 pb**

**Desnaturalización inicial:** 94°C por 15 min

**Ciclado:** 25 ciclos: 94°C 30 seg—58°C 90 seg---72°C 60 seg

**Extensión final:** 72°C por 10 min

**Fuente:** (Liu, 2012)

**Elaborado por:** Autor

### **3.4. Análisis estadístico.**

El análisis estadístico se realizó mediante estadística descriptiva utilizando tablas de porcentajes.

## **CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### 4.1. Selección de cepas resistentes a colistina

Para la selección de las cepas resistentes a colistina se utilizaron dos métodos. Mediante el método de difusión en disco del total de cepas de 19,60 % (21) presentaron un halo  $\leq 10$  mm (Tabla 2), representados por el 7,52%(6) y 55,50%(15) correspondientes a cepas provenientes de humanos y vegetales respectivamente (Tabla 3) y el 68,20%(73) entre 11-13 mm.

**Tabla 2.** Porcentaje de cepas resistentes a colistina mediante método de difusión en disco.

Número de muestras	Halos $\leq 10$ mm	Halos 11- 13 mm	Halos $\geq 14$ mm
107	19,60% (21)	68,20 (73)	12,15% (13)

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

**Tabla 3.** Porcentaje de cepas resistentes a colistina mediante método de difusión en disco dependiendo del origen de la muestra.

Origen de la muestra	Número de muestras	Halos $\leq 10$ mm	Halos 11- 13 mm	Halos $\geq 14$ mm
Tracto urinario	80	7,52%(6)	81,25%(65)	11,25%(9)
Vegetales	27	55,50%(15)	29,62%(8)	14,81%(4)

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

En relación al segundo método utilizado se obtuvo un crecimiento bacteriano en el 52.33% (56) cepas, las mismas que fueron consideradas como resistentes.

**Tabla 4.** Porcentaje de cepas resistentes a colistina mediante método de dilución.

Número de muestras	Crecimiento bacteriano en MacConkey concentración de 2 mg/L de colistina
107	56 ( 52,33%)

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

## 4.2. Identificación molecular del gen.

El análisis molecular para la determinación del gen *mcr-1* se lo realizó en las cepas con halos  $\leq 10$  y 11-13 mm a la colistina y aquellas que crecieron en agar MacConkey suplementado con colistina al 2mg/l, como resultado posterior a la visualización de la PCR en un gel de agarosa 1.5% no se obtuvo la banda esperada de 309 pares de bases.

## 4.3 Discusión

La colistina según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se encuentra en categoría de antibióticos de “reserva” y debería ser considerado como fármaco de último recurso para el tratamiento de pacientes con infecciones causadas por bacterias gram negativas multirresistentes. El uso prolongado de colistina está relacionado con graves efectos colaterales como neurotoxicidad y nefrotoxicidad, motivo por el cual fue sustituido por las cefalosporinas y aminoglucósidos hasta la década de los 60.

A causa del surgimiento de la resistencia bacteriana las polimixinas se volvieron a usar a partir de los años 90. Este aumento significativo en su uso también ha puesto de manifiesto la emergencia de su resistencia, cuyo principal mecanismo es el cromosómico que dan como resultado modificaciones en la estructura del lípido A de la pared bacteriana impidiendo la interacción entre el antibiótico y la bacteria. A partir del 2015 se ha descrito resistencia a colistina codificada en plásmidos, es decir en elementos móviles transferibles aun entre diferentes especies, lo que puede reducir todavía más el arsenal terapéutico actualmente disponible (Medina J et al., 2017). Además, la resistencia de *E. coli* a colistina incluye factores extrínsecos como malos criterios de dosificación, se administra en forma inactiva dando concentraciones insuficientes.

Para la detección de la resistencia bacteriana a colistina mediante métodos fenotípicos manuales existen cuatro metodologías: microdilución en caldo, Etest, dilución en agar y determinación del tamaño del halo de inhibición por difusión en disco. En el presente estudio se utilizó los métodos disponibles en nuestro laboratorio como son difusión en disco y dilución en agar obteniendo los siguientes resultados 19,60% y 52,33% respectivamente, evidenciando una diferencia de concordancia del 32.73% entre los dos métodos. Cabe indicar que el método de difusión en disco es considerado como un método cuestionado ya que no cuenta con puntos de corte disponibles por el CLSI y el EUCAST, la información utilizada en esta investigación es la reportada por el

Laboratorio de Referencia de la Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos donde menciona que aislamientos con halos  $\leq 10$  mm se asociaron con alta confianza con CIM en la categoría de resistentes, mientras que cepas con halos  $\geq 14$  mm se corresponden con una CIM sensible. En relación, a los métodos utilizadas para calcular la CIM en agar (dilución en agar o Etest) la bibliografía menciona que tienden a sobrestimar en hasta una dilución la CIM de colistina. Por consiguiente, la prueba *gold estándar* para la selección de bacilos gram negativos resistentes a colistina es la microdilución en caldo.

Para diferenciar la naturaleza del mecanismo implicado en la resistencia encontrada en nuestro estudio se realizó la detección del gen *mcr-1* y ninguna cepa expresó la presencia del gen. Es posible que en estas cepas la resistencia se encuentre asociada a otros genes que confieran resistencia cromosómica o a otras variantes del *mcr-1* ya descritas como *mcr-2* a *mcr-8*. Este gen es responsable del mecanismo plasmídico de resistencia a colistina en *Enterobacteriaceae*, tanto en animales como en humanos, que codifica para una fosfoetanolamina transferasa, capaz de modificar el sitio blanco y así disminuir la afinidad del colistina por el lípido A (Aguayo et al., 2016).

El gen fue identificado por primera vez en 78 (15%) cepas de *E. coli* provenientes de 523 de alimentos, 166 de animales para consumo y 16 de muestras clínicas provenientes de pacientes hospitalizados en China (Liu, Y. et al., 2016). Posterior a este evento se ha descrito la presencia del gen *mcr-1* en varios países de los cuatro continentes incluido América. A nivel de Ecuador existe un aislamiento a partir de líquido peritoneal de un varón de 14 años con apendicitis aguda (Ortega & Barba, 2016). En un estudio realizado en Brasil reportan el análisis de 4,620 aislamientos de enterobacterias recolectadas durante los años 2000-2010 a partir de muestras de humanos, animales, ambientales y alimentos, se realizó un *screening* utilizando MacConkey suplementado con colistina (2mg/L) y se evidenció el crecimiento de 515 cepas y únicamente en 16/515 se determinó la presencia del gen *mcr-1* las mismas que eran provenientes de animales utilizados como alimento (pollo y cerdo), asimismo 137/515 y 1/515 cepas originarias de aislamientos a partir de infecciones-colonizaciones en humanos y vegetales respectivamente mostraron ausencia del gen *mcr-1* (Fernández et al., 2016) similar a lo ocurrido en nuestro estudio. En Paraguay, de las 150 cepas con resistencia a colistina obtenidas a partir de muestras de orina en 7 de ellas se confirmó la portación del gen *mcr-1* (4,7 %) (Touchet et al., 2018).

Finalmente, en el Ecuador está aprobado el uso de las polimixinas en la producción veterinaria y de alimentos para animales, pero aun la cantidad de uso no está disponible. Este creciente uso ha propuesto que las cepas *mcr-1* sean el resultado del abuso de la colistina en la producción animal los mismos que pueden actuar como reservorio y propagarla al medio ambiente, siendo un factor de riesgo importante el contacto de los humanos con las áreas de producción animal lo que contribuye a la diseminación de las cepas.

## CONCLUSIONES

Se determinó mediante métodos fenotípicos la resistencia de *E. coli* a colistina encontrándose en un porcentaje del 19.60 % mediante el método de difusión en disco y 52.33% por el método de dilución.

Mediante métodos genotípicos se descartó la presencia del gen *mcr-1* sospechando que la resistencia a la colistina en nuestras cepas esta mediada por mecanismos cromosómicos o por otras variantes del gen *mcr*.

## RECOMENDACIONES

La colistina puede ser utilizada en pacientes con patologías causadas por *E. coli*, resistentes a múltiples antibióticos; sin embargo, debe estar bien documentado su administración ya que el uso inadecuado conlleva a que se prolongue la duración de la enfermedad infecciosa, aumenta las interacciones farmacológicas, los costos asistenciales, la carga económica sobre las familias y la sociedad y el riesgo de muerte.

Se recomienda medidas de bioseguridad en el cultivo de vegetales para evitar que se contaminen por la bacteria *E. coli* resistente a colistina, así mismo que las autoridades sanitarias realicen controles estrictos de los vegetales que se expenden a la población.

Que se realicen estudios de determinación de *E. coli* de las diferentes variantes del gen *mcr-1*, realizándola con una PCR múltiple con cebadores para cada variante como para: *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, con diferentes muestras para que se compare con estudios del Ecuador, exterior y de esta forma determinar si en la provincia de Loja en los animales existe este gen *mcr-1*; así como para observar si existe otro tipo de *mcr-1*, cabe recalcar que tenemos una variabilidad genética en nuestro medio en humanos y vegetales.

## BIBLIOGRAFIA:

- Aguayo, A., Mella, S., Riedel, G., Bello, H., Domínguez, M., & González, G. (2016). Colistín en la era post-antibiótica. *Rev Chilena Infectol*, 33(2), 166–176. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182016000200006>
- Alvarez, F., Baquero, F., Bouza, E., García, J., Gobernado, M., Mensa, J., ... Torres, A. (2015). Los betalactámicos en la práctica clínica. revista española de quimioterapia. *Revista Española de Quimioterapia*, 28(1), 60.
- Brooks, G., Butel, J., & Morse, S. (2011). Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg, 25a EDICIÓN, 915.
- Cahuayme-Zuniga, L., & Kontoyiannis, D. P. (2010). Is it Safe to Proceed with Stem Cell Transplant in Cancer Patients Treated for Cryptococcal Infection? A Focus on Recent IDSA Cryptococcal Guidelines. *Clinical Infectious Diseases*, 50(12), 1687–1689. <https://doi.org/10.1086/653010>
- Casellas, J. (2011). Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. *Rev Panam Salud Publica*, 30(6), 519–528. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892011001200004>
- CDC. (2016). First mcr-1 gene in E. coli bacteria found in a human in United States. *Center for Disease Control and Prevention*.
- Celis, Y. (2012). Escherichia coli uropatógena resistente a múltiples antibióticos: un problema de salud pública. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*, 30(1). Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnsp/v30s1/v30s1a20.pdf>
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., & Bonacorsi, P. (2000). Rapid and Simple Determination of the Escherichia coli Phylogenetic Group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4555–4558. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000>. Updated
- Contreras, C., Riveros, M., Lluque, A., & Barletta, F. (2011). ARTÍCULO ORIGINAL FRECUENCIA Y PATOTIPOS DE Escherichia coli DIARROGÉNICA EN NIÑOS PERUANOS CON Y SIN DIARREA FREQUENCY AND PATHOTYPES OF DIARRHEAGENIC Escherichia coli IN PERUVIAN CHILDREN WITH AND WITHOUT DIARRHEA, 28(1), 13–20. <https://doi.org/10.1590/S1726-46342011000100003>

- Farfán, A., Ariza, S., Vargas, F., & Vargas, L. (2016). Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Programa de Bacteriología Y Laboratorio Clínico*, 33(4), 438–450.
- Fernandes, M., Moura, Q., Sartori, L., Silva, K., Cunha, M., Esposito, F., ... Linopan, N. (2016). Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene, 21(17), 1–6.
- Fica, A. (2014). Resistencia antibiótica en bacilos Gram negativos , cocáceas Gram Implicancias terapéuticas. *Revista Medica Clinica Condes*, 25(3), 432–444.
- Franco, P., Ramirez, L., Orozco, M., & Lopez, L. (2013). Determination of *Escherichia Coli* and identification of the o157:h7 serotype in pork's meat commercialized in the most important supermarkets in Cartagena, Colombia. *Revista Lasallista de Investigación*, 10(1), 91–100. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(85\)90072-1](https://doi.org/10.1016/0167-7799(85)90072-1)
- García, H., García, V. E., Hernández, T. A., Ruiz, J., Yagüe, G., & Herrero, José Antonio y Gómez, J. (2011). Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): Significación clínica y perspectivas actuales. *Revista Espanola de Quimioterapia*, 24(2), 57–66.
- Guillen, L., Millan, B., & Araque, M. (2014). Caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mérida, Venezuela. *Infectio*, 18(3), 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.infect.2014.04.004>
- Liu, Y. Y. (2012). Protocolo de PCR para la detección del gen *mcr-1* en aislamientos de bacilos gram-negativos. *Institutos de Salud (ANLIS) "Dr. Carlos G. Malbrán,"* 3099(15), 2012. Retrieved from <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2013/02/Detección-NDM.pdf>
- Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., ... Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2), 161–168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
- López, D., Torres, M., & Prada, C. (2016). Genes de resistencia en bacilos Gram negativos: Impacto en la salud pública en Colombia. *Universidad Y Salud*, 18(1), 190–202. <https://doi.org/10.22267/rus.161801.30>
- Malbran, C. (2016). Emergencia de resistencia plasmidica (transferible) a colistina/polimixina B

- MCR-1 en Argentina. *OMS/OPS*, 1–9.
- Marchese, A. (2016). Superbacterias portan nuevo gen que les hace resistir a todos los antibacterianos. Retrieved from <http://www.revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/view/15351/15818>
- Márquez, H., & Quiroz, Iliana, y col. (2018). Genes de Virulencia y Grupo Filogenético en Aislados de Escherichia Coli Patogénica Aviar. *Archivos de Medicina*, 14(2), 4. <https://doi.org/10.3823/1378>
- Marrero, J., Toppes, M., & Castellanos, J. (2015). Infección del tracto urinario y resistencia antimicrobiana en la comunidad. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 31(1), 78–84.
- Medina, D. J., Paciel, D., Noceti, O., & Rieppi, G. (2017). Actualización acerca de colistina ( polimixina E ): aspectos clínicos , PK / PD y equivalencias, 33(3), 111–122.
- Millan, Y., Hernandez, E., Millan, B., & Araque, M. (2014). Distribución de grupos filogenéticos y factores de virulencia en cepas de Escherichia coli uropatógena productora de B-lactamasa CTX-M-15 aisladas de pacientes de la comunidad en Mérida, Venezuela. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(1), 14–23.
- Monclús, E., Ocejo, D. N., Sánchez, M. S., & Romero, M. O. (2015). ENCUESTA EL PERSONAL SANITARIO EN LA PRESCRIPCIÓN Y Detección mediante encuesta de las dificultades con las que se encuentra el personal sanitario en la prescripción y administración de antibióticos en la práctica clínica diaria de un servicio de urgenci, (May), 5.
- Morejón, G. M. (2013). Betalactamasas de espectro extendido. *Revista Cubana de Medicina*, 52(4), 272–280. [https://doi.org/10.1016/0294-3506\(95\)80190-1](https://doi.org/10.1016/0294-3506(95)80190-1)
- Mustos, A., Bosisio, N., Do Nascimento, M., Iserete, J., Orellana, M., Rota, R., ... Stephan, B. (2013). *Microbiología y Parasitología*. (L. A. Mezzadri, Ed.) (SEGUNDA). BUENOS AIRES.
- OPS, & OMS. (2016). Alerta epidemiológica enterobacterias con resistencia trans. *Organización Panamericana de La Salud/ Organización Mundial de La Salud*.
- Ortega, D., & Barba, P. (2016). Colistin resistant Escherichia coli isolate harbouring the mcr-1 gene in Ecuador, 1–4.

- Osorio, J., Barreto, J., Samboni, C., Cándelo, L., Álvarez, L., Benavidez, S., ... Gomez, C. (2017). Factores asociados a nefrotoxicidad por Polimixina B en un hospital universitario de Neiva, Colombia. 2011-2015. *Rev Chilena Infectol*, 34(1), 7–13.
- Padgett, D., Luque, M., Rivera, D., Galindo, C., Zepeda, L., & Hernandez, A. (2011). Resistencia antimicrobiana en bacterias aisladas en el Instituto Hondureño de Seguridad Social, 79(3), 117–121.
- Quizhpe, A., Encalada, L., Sacoto, A., Calvo, D., Lara, M., Andrade, D., ... Sivaraman, S. (2014). Uso apropiado de antibióticos y resistencia bacteriana. *AFEME*.
- Serra, V. Á. M. (2017). CIENCIAS EPIDEMIOLOGICAS Y SALUBRISTAS La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana Microbial resistance in the current context and the importance of knowledge and applicati, 402–419.
- Torres, C. (2012). La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming. *Discurso de Recepción Académica*, 15–38. <https://doi.org/Z 2046-2012>
- Touchet, N., Martínez, M., Franco, R., Falcón, M., Busignani, S., Espínola, C., ... Ortellado, J. (2018). Resistencia plasmídica a colistin por el gen mcr-1 en Enterobacteriaceae en Paraguay. *Revista Salud Pública Del Paraguay*, 8(1), 44–48. Retrieved from <http://www.ins.gov.py/revistas/index.php/rspp/article/view/507>
- Tucto-succhil, S., Hurtado-escamilo, P. M. T., Microbiología, A. P. De, Nacional, U., Unt, D. T., & Perú, T. (2014). Resistencia Bacteriana según MIC 90 de Escherichia coli uropatógena aislada en el Laboratorio de Microbiología del Hospital II, 2(1).