



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
AMBIENTALES**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

“CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE *Escherichia coli* PRODUCTORES DE
B-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO EN VEGETALES CRUDOS
COMERCIALIZADOS EN IBARRA”

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO/A EN INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORA:

ALEJANDRA JACQUELINE PLASENCIA BEDON

DIRECTOR:

PEDRO MIGUEL BARBA ESTRELLA MSC.

Ibarra – Ecuador

2020

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

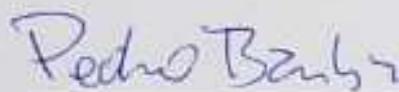
"CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE *Escherichia coli* PRODUCTORES DE B-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO EN VEGETALES CRUDOS COMERCIALIZADOS EN IBARRA"

Tesis de Grado revisada por el Comité Asesor; por lo cual, se autoriza su presentación como requisito parcial para obtener el Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

APROBADA:

PEDRO MIGUEL BARBA ESTRELLA MSc.
DIRECTOR



SANTIAGO ZARATE MSc.
ASESOR



VALERIA OLMEDO MSc.
ASESORA



CRISTINA ECHEVERRÍA PhD.
ASESORA





UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN
A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	100377856-8		
APELLIDOS Y NOMBRES:	PLASENCIA BEDÓN ALEJANDRA JACQUELINE		
DIRECCIÓN:	EJIDO DE CARANQUI - HERNÁN GONZALES DE SAA		
EMAIL:	ajplasenciab@utn.edu.ec		
TELÉFONO FIJO:	651 558	TELÉFONO MÓVIL:	0967722077

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	"CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE <i>Escherichia coli</i> PRODUCTORES DE B-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO EN VEGETALES CRUDOS COMERCIALIZADOS EN IBARRA"
AUTOR (ES):	PLASENCIA BEDÓN ALEJANDRA JACQUELINE
FECHA: DD/MM/AAAA	10 de febrero del 2020
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO <input type="checkbox"/> POSGRADO
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA
ASESOR /DIRECTOR:	MSc. PEDRO BARBA

2. CONSTANCIAS

El autor (es) manifiesta (n) que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto la obra es original y que es (son) el (los) titular (es) de los derechos patrimoniales, por lo que asume (n) la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá (n) en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 10 días del mes de febrero de 2020

EL AUTOR:

(Firma).....
Nombre: PLASENCIA BEDÓN ALEJANDRA JACQUELINE

CERTIFICACIÓN DE AUTORÍA

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por el estudiante: ALEJANDRA
JACQUELINE PLASENCIA BEDÓN, bajo mi supervisión.



Pedro Miguel Barba Estrella MSc.

DIRECTOR DEL PROYECTO

REGISTRO BIBLIOGRÁFICO

Guía: FICATA-UTN

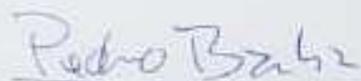
Fecha: Ibarra, a los 10 días del mes de febrero del 2020

Yo, ALEJANDRA JACQUELINE PLASENCIA BEDÓN, como autora de la Tesis Titulada "CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE *Escherichia coli* PRODUCTORES DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO EN VEGETALES CRUDOS COMERCIALIZADOS EN IBARRA", me hago responsable de los resultados, discusión, conclusiones y demás parte de la investigación; y pongo este documento como fuente de apoyo para consultas dirigidas a todos los estudiantes.

Universidad Técnica del Norte. Carrera de Ingeniería en Biotecnología. Ibarra, a los 10 días del mes de febrero del 2020. 65 páginas.

DIRECTOR: MCs. Pedro Miguel Barba Estrella

El objetivo de la presente investigación fue: Caracterizar aislados de *Escherichia coli* productores de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) obtenidos a partir de vegetales crudos comercializados en la ciudad de Ibarra. Entre los objetivos específicos se encuentran: determinar la presencia de *Escherichia coli* BLEE en productos vegetales destinados al consumo en Ibarra. Identificar la presencia de genes de resistencia tipo BLEE en las cepas aisladas y su relación clonal. Socializar la problemática de la resistencia bacteriana a antimicrobianos en la comunidad ibarreña.



MCs. Pedro Miguel Barba Estrella
Director del trabajo de grado



Alejandra Jacqueline Plasencia Bedón
Autora

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradezco a Dios por guiar mi camino y orientarme hacia donde me encuentro en la actualidad.

A la Universidad Técnica del Norte por brindarme la oportunidad por formar parte de ella y a la Carrera de Ingeniería en Biotecnología por la formación profesional y facilitarme el espacio e insumos para el desarrollo de mi tesis.

A mi director de tesis MSc. Pedro Barba por la dirección en mi proyecto de tesis y por su paciencia durante la transición del mismo; de igual manera a todos los docentes que compartieron sus conocimientos conmigo y que contribuyeron para mi formación.

A mi familia que ha contribuido siempre en mi educación y brindarme su apoyo.

A mis compañeros, amistades y personas que de una u otra manera me apoyaron en el desarrollo de mi trabajo de tesis.

Alejandra Jacqueline Plasencia Bedón

DEDICATORIA

A mi familia por brindarme siempre su apoyo, en especial a mis padres Pilar Bedón y Juan Plasencia por darme la vida y educarme, de igual forma a mi hermano mayor Carlos Plasencia por estar siempre pendiente de mí y apoyarme en todo, y a mis hermanas Cecilia y Cristina por darme ánimos para seguir adelante. A mis profesores que han aportado con su conocimiento y a mis amistades que han compartido conmigo la experiencia universitaria.

Índice de contenidos

.....	- 4 -
AGRADECIMIENTO.....	- 5 -
DEDICATORIA.....	- 6 -
Índice de contenidos.....	- 7 -
Índice de figuras.....	- 9 -
Índice de tablas.....	- 9 -
RESUMEN.....	- 10 -
CAPÍTULO I.....	- 12 -
1. INTRODUCCIÓN.....	- 12 -
1.1. REVISIÓN LITERARIA.....	- 14 -
1.1.1. Resistencia antimicrobiana de <i>Escherichia coli</i>	- 14 -
1.1.2. Cefalosporinas	- 15 -
1.1.3. Enzimas β -lactámicas	- 16 -
1.1.4. Vegetales de estudio	- 20 -
1.1.5. Mercados de Ibarra	- 22 -
1.2. MARCO LEGAL.....	- 23 -
1.2.1 Constitución de la República del Ecuador del año 2008	- 23 -
1.3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	- 24 -
1.4. JUSTIFICACIÓN.....	- 25 -
1.5. PREGUNTA DIRECTRÍZ DE INVESTIGACIÓN.....	- 26 -
1.6. OBJETIVOS.....	- 26 -
1.6.1. Objetivo general	- 26 -
1.6.2. Objetivos específicos	- 26 -
1.7. HIPÓTESIS.....	- 26 -
CAPÍTULO II.....	- 27 -
2. METODOLOGÍA.....	- 27 -
2.1. Descripción del área de estudio.....	- 27 -
2.2. Muestreo de los vegetales en los mercados anteriormente mencionados.....	- 27 -
2.3. Encuestas realizadas a expendedores y consumidores.....	- 28 -
2.4. Procesamiento de las muestras vegetales.....	- 29 -
2.6. Aislamiento de cepas.....	- 30 -
2.7. Confirmación de la producción de β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE).....	- 31 -
2.8. Extracción de ADN de las cepas aisladas.....	- 32 -

2.9. Identificación molecular de las cepas aisladas	- 33 -
2.9.1. <i>Electroforesis</i>	- 33 -
2.9.2. <i>Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</i>	- 34 -
2.9.3. <i>PCR palindrómica extragénica repetitiva basada en BOX-AIR</i>	- 36 -
2.10. Análisis estadístico	- 37 -
CAPÍTULO III	- 38 -
3. RESULTADOS	- 38 -
3.1. Muestreo y aislamiento de bacterias	- 38 -
3.2. Aislados productores de BLEE	- 39 -
3.3. Identificación de genes de estudio	- 40 -
3.3.1. <i>Análisis filogenético</i>	- 41 -
3.4. Encuestas a expendedores	- 41 -
3.5. Encuestas a los consumidores	- 42 -
CAPÍTULO IV	- 46 -
4. DISCUSIÓN	- 46 -
CAPÍTULO V	- 52 -
5.1. Conclusiones	- 52 -
5.2. Recomendaciones	- 53 -
CAPÍTULO VI	- 54 -
5. ANEXOS	- 54 -
6.1. Anexo 1. Encuesta a expendedores de los vegetales en los puestos de venta de los tres mercados de Ibarra	- 55 -
6.2. Anexo 2. Encuesta a consumidores de los vegetales en los tres mercados de la ciudad de Ibarra	- 55 -
BIBLIOGRAFIA	57

Índice de figuras

Figura 1. Mapa de la localización del cantón Ibarra – Ecuador.....	- 27 -
Figura 2. Toma de muestras vegetales en los mercados de Ibarra	- 27 -
Figura 3. Encuestado hacia consumidores	- 28 -
Figura 4. Desprendimiento de los microorganismos adheridos a las muestras vegetales..	- 29 -
Figura 6. Proceso de limpieza del filtro para cambiar la filtración del vegetal	- 29 -
Figura 5. Muestras vegetales en agua peptonada	- 29 -
Figura 7. Conteo de colonias mediante el uso del estereoscopio	- 30 -
Figura 8. Crecimiento de cepas obtenidas de las disoluciones filtradas	- 30 -
Figura 9. Aislamiento de cepas con morfología de interés	- 30 -
Figura 10. Criopreservación de las cepas puras para posteriores estudios	- 31 -
Figura 11. Medición de densidad óptica en la escala de MacFarland 0.5.....	- 31 -
Figura 12. Prueba de doble disco para la identificación de BLE..	- 32 -
Figura 13. Proceso de extracción de ADN.....	- 33 -
Figura 14. Preparación de TBE	- 33 -
Figura 15. Corrida de electroforesis.....	- 34 -
Figura 16. Revelado del gel de electroforesis	- 35 -
Figura 17. Análisis del resultado de BOX-PCR con las cepas de <i>E. coli</i>	- 37 -
Figura 18. Aislados de bacterias resistentes a cefotaxima según los mercados.....	- 38 -
Figura 19. Aislados de bacterias resistentes a cefotaxima según los vegetales	- 38 -
Figura 22. Cantidad de vegetales que presentaron bacterias productoras de BLEE.....	- 39 -
Figura 23. Identificación de cepas productoras de BLEE según el vegetal	- 39 -
Figura 24. Identificación de la identidad de las bacterias resistentes a C3G	- 39 -
Figura 25. Dendograma del análisis clonal de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas	- 41 -
Figura 26. Limpieza del sitio de venta	- 42 -
Figura 27. Procedencia de los vegetales	- 42 -
Figura 28. Abastecimiento de productos.....	- 42 -
Figura 29. Tiempo de producción de vegetales	- 42 -
Figura 30. Pregunta 1	- 43 -
Figura 31. Pregunta 2	- 43 -
Figura 32. Pregunta 3	- 43 -
Figura 33. Pregunta 4	- 43 -
Figura 34. Pregunta 5	- 44 -
Figura 35. Pregunta 6	- 45 -
Figura 36. Pregunta 7	- 45 -
Figura 37. Pregunta 8	- 45 -
Figura 39. Pregunta 10	- 45 -
Figura 40. Evaluación sobre el conocimiento de resistencia antimicrobiana	- 46 -

Índice de tablas

Tabla 1.	- 35 -
Tabla 2.	- 36 -
Tabla 3.	- 36 -

RESUMEN

Debido al contacto entre microorganismos patógenos con dosis sub-inhedorias de antibióticos, se promueve la evolución de cepas bacterianas resistentes a múltiples familias de antibióticos. Una de las vías de diseminación de estas cepas al ser humano son los vegetales, ya que en el proceso de cultivo estos pueden ser contaminados, provocando posteriormente graves enfermedades intra y extra-intestinales en los seres humanos que los consumen sin la adecuada asepsia. Por lo cual, el presente trabajo propone determinar la presencia/ausencia de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en distintos productos vegetales de consumo crudo comercializados en la ciudad de Ibarra - Ecuador.

Se realizó un muestreo de conveniencia por triplicado de cada vegetal estudiado (lechuga, perejil, cilantro, pimiento, tomate y apio). Se aisló cepas de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de tercera generación en medio de cultivo MacConkey suplementado con 3 μ L/mL de cefotaxima. Se identificó por PCR la presencia de los genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, de resistencia a β -lactámicos de espectro extendido, los genes *bla*_{KPC} y *bla*_{NDM} de resistencia a carbapenémicos, y el gen *mcr-1* de resistencia a colistina. La variante alélica de estos genes se identificó mediante secuenciación. La relación clonal se analizó mediante BOX-PCR y el programa informático BioNumerics. Además, se socializó la problemática de la resistencia bacteriana a antimicrobianos a la comunidad ibarreña a través de medios de comunicación y se realizó encuestas para medir el conocimiento sobre la problemática de resistencia a antimicrobianos.

Los resultados obtenidos fueron analizados con el programa estadístico IMB SPSS, mediante la prueba de chi-cuadrado para medir la presencia/ausencia de *E. coli* productora de BLEE, en el cual se pudo observar que, el mercado 1 presentó mayor cantidad cepas resistentes y se observó que el apio, cilantro, lechuga y perejil tienen un crecimiento similar de dichas bacterias.

En posteriores estudios, se debería analizar la presencia de otros genes productores de β -lactamasas de espectro extendido que han sido reportados con menor incidencia, como los del grupo AmpC, GES y OXA. Además, se recomienda evaluar el perfil de susceptibilidad a otras familias de antibióticos. Más aun, se sugiere ampliar el muestreo a otros productos vegetales, para determinar las posibles fuentes de contaminación.

Palabras clave: *Escherichia coli*, BLEE, vegetales, genes de resistencia bacteriana.

ABSTRACT

Due to the contact between pathogenic microorganisms with sub-inhibitory doses of antibiotics, bacterial strains resistance to multiple families of antibiotics is developed. One of the dissemination routes of these strains are vegetables. This degree work aims to determine the presence/absence of *Escherichia coli* producers of extended spectrum β -lactamases (ESBL) in different vegetable products marketed in the city of Ibarra - Ecuador.

A triplicated convenience sample was performed in each of the studied vegetables (lettuce, parsley, cilantro, pepper, tomato and celery). Third-generation cephalosporin-resistant *E. coli* strains were isolated in a MacConkey culture medium supplemented with 3 μ L/mL cefotaxime. The presence of *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, extended-spectrum β -lactam resistance genes, *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} genes for carbapenemic resistance, and the *mcr-1* colistin resistance gene were identified by PCR. The allelic variant of these genes was identified through DNA sequencing. The clonal relationship was analyzed using BOX-PCR and the BioNumerics program. In addition, bacterial resistance to antimicrobials was socialized to Ibarra citizens through media and surveys to assess knowledge about the problem of antimicrobial resistance.

The results were analyzed with IMB SPSS, using the chi-square test to measure the presence/absence of ESBL-producing *E. coli*, in the market 1 was the one with the highest number of resistant strains and it was observed that celery, cilantro, lettuce and parsley have a similar growth of this bacteria. In subsequent studies, the presence of other genes with extended spectrum β -lactamases with lower incidence, such as those of the AmpC, GES and OXA group, need to be analyzed. It is also recommended to evaluate the susceptibility profile to other antibiotic families. Moreover, it is suggested to extend the sampling to other plant products, to determine possible sources of contamination.

Keywords: *Escherichia coli*, ESBL, vegetables, bacterial resistance genes.

Vladimir Rodryg



CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

Según declaraciones de la OMS en el año 2015, dos millones de personas mueren cada año en todo el mundo, a consecuencia de enfermedades provocadas por la ingesta de alimentos insalubres. Una de las principales causas de infecciones comunes graves como: septicemia, diarrea, neumonía, infecciones urinarias o gonorrea, es la resistencia bacteriana hacia los antibióticos (OMS, 2014). La OMS evidenció que, en 21 países de América Latina, existe una elevada resistencia a cefalosporinas de tercera generación y a fluoroquinolonas en *E. coli*, que oscila entre el 8% al 65% (OMS, 2018).

Dentro de los mecanismos de resistencia bacteriana destaca el de las betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Esta familia de enzimas producidas por bacilos gramnegativos, en su mayoría derivan de las betalactamasas clásicas CTX, TEM y SHV a partir de una serie de mutaciones puntuales que afectan a su centro activo (García, et al., 2011).

Las enzimas TEM provienen de las clásicas TEM-1 y TEM-2 contenidas en plásmidos (Ferreira, et al., 2011). Las SHV son de origen cromosómico y las CTX-M son las BLEE de mayor reporte mundial, predominando en agentes de infecciones nosocomiales por *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.* Debido a la amplia diversidad y rápida diseminación, CTX-M es capaz de exhibir diferentes fenotipos de resistencia como los del grupo: 1, 2, 8, 9,14 y 15 (Rivera, Ulloa, Clavo, López, & Gil, 2015). Las cepas BLEE tipo TEM y SHV, hidrolizan a ceftazidima con mayor eficiencia que a ceftriaxona o cefotaxima, mientras que las CTX-M. Comúnmente, hidrolizan cefotaxima y ceftriaxona más rápidamente que ceftazidima. Además, se encuentran otras familias de BLEE como PER, VEB-1 y BES-1 (Tafur, Villegas, & Torres, 2008).

Las enzimas de tipo KPC, mediante plásmidos otorga resistencia a β -lactámicos, cefalosporinas, penicilina y monobactámicos, generalmente con nivel de resistencia intermedio a los carbapenemes (Castanheira et al., 2016). El gen *bla*_{KPC} se originó en Carolina del Norte en el año de 1996. Los primeros casos de resistencia microbiana fueron encontrados en países de América del Sur durante el año 2010, desde entonces se han detectado variantes a nivel mundial (Paciel, Rieppi, Buroni, & Medina, 2011).

La Nueva Delhi Metallo- β -lactamasa (NDM), es una carbapenemasa adquirida de clase B (Diep et al., 2015). Inicialmente, reportada en India en un paciente suizo, que a partir del 2009

se han reportado varios casos en Asia y América Del Sur en aislados de *E. coli*; aunque en su mayoría no hidroliza monobactámicos existen algunas cepas productoras de esta encima que lo hacen y que resultan difíciles de tratar (Correa, et al., 2017).

Las mutaciones a nivel cromosomal que generan la resistencia a colistina, provienen de una modificación del lipopolisacárido en la pared bacteriana. Siendo el gen *mcr-1*, el que codifica para una fosfoetanolamina transferasa que modifica el lípido A de la membrana externa (Yao, et al., 2016). Además, posee un potencial con capacidad de diseminación horizontal, el cual fue descrito en aislados de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en el año 2016. A partir de esta fecha, se ha detectado su presencia en seres humanos, animales, alimentos y en el ambiente (Legarraga et al., 2018).

La resistencia bacteriana ha aumentado en el transcurso del tiempo, causando infecciones tanto adquiridas tanto en el ambiente comunitario como en el hospitalario, representando cifras entre el 50% y 60%, respectivamente (Tafur et al., 2008). Por otro lado, en el sistema de vigilancia epidemiológica para la resistencia bacteriana de la Secretaria de Salud Distrital de Bogotá (SIVIBAC), se reportó en el año 2009, que la resistencia en *E. coli* fue un 11% a ceftazidima y 23% a ciprofloxacina (GREBO, 2010).

Durante los años 2007 y 2008, en Brasil, se reportó en un estudio en pacientes hematológicos que existía un 70.6% de cepas de *E. coli* BLEE, que portaban los genes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}* y *bla_{OXA}* (Ferreira et al., 2011). Posteriormente, en la universidad de Salamanca, entre el 2008 y 2011, se encontró bacterias productoras de BLEE en muestras de hemocultivos. Donde se las clasificó como infecciones nosocomiales y comunitarias, donde el 73.5% de las infecciones fueron causadas por *E. coli*. Éstas bacterias se encuentra estrechamente ligadas a los cuidados sanitarios, al tratamiento indiscriminado con antibióticos y a diferentes factores asociados a la inmunodepresión (Perianes et al., 2014).

En el Ecuador, se realizó un estudio que evidenció la prevalencia de *E. coli* BLEE en vegetales en la ciudad de Quito, siendo la alfalfa la muestra con mayor cantidad de esta bacteria (Ortega, Barba, Mena, & Zurita, 2018). Además, en un estudio sobre *E. coli* BLEE en camales industriales de la provincia de Pichincha, se muestra que la prevalencia en las vísceras de los animales faenados fue 3.38 UFC/g Log10 (Pérez, 2015). Éstos son los únicos estudios que se han realizado en el país sobre *E. coli* BLEE en alimentos.

En el presente trabajo, se evaluó la presencia de *E. coli* BLEE en vegetales de consumo crudo, comercializados en 3 mercados de Ibarra; identificando la presencia de genes BLEE y sus respectivas variantes, usando PCR y secuenciación genética. Además, se encuestó a consumidores de estos mercados para medir el nivel de conocimiento con respecto a la problemática existente sobre la resistencia bacteriana hacia los antibióticos y socializarlo a la población ibarreña mediante exposiciones y radiodifusión. De igual manera, se encuestó a comerciantes de los 3 mercados para identificar la procedencia de los vegetales y si se maneja algún protocolo de limpieza. Obteniendo resultados que presentan bacterias portadoras de genes BLEE en los vegetales de estudio y que a su vez tienen relación con la limpieza que se aplica dentro de cada mercado. Reportando de esta manera las bases necesarias para la continuidad de investigaciones sobre la resistencia antimicrobiana con genes BLEE en la ciudad de Ibarra.

1.1. REVISIÓN LITERARIA

1.1.1. Resistencia antimicrobiana de Escherichia coli

La bacteria *Escherichia coli* fue descrita por primera vez en 1885 por Theodore von Escherich, esta bacteria según el paso del tiempo y las condiciones medioambientales ha ido evolucionando (Bajaj, Singh, & Viridi, 2016). Se ha demostrado que las cepas hospedadoras en su mayoría carecen de determinantes de virulencia especializados y son beneficiosas para su huésped (Farfán, Asiza, Vargas, & Vargas, 2016).

Asimismo, se han descubierto otras cepas de *E. coli* son patógenas, las cuales, causan un amplio espectro de enfermedades (Baker, 2015). Las cepas de *E. coli* patógenas, en su gran mayoría provocan infecciones extraintestinales que amenazan la vida de su huésped; para su adecuado tratamiento, se debe administrar fármacos que usan como base los β -lactámicos (Pfeifer, Cullik, Witte, 2010).

La resistencia antimicrobiana es la capacidad que tienen las bacterias de soportar los efectos de los antibióticos destinados a eliminarlas o controlarlas; esto se produce cuando los microorganismos sufren cambios al verse expuestos a estas drogas en dosis sub-inhedorias (OMS, 2017).

Las enterobacterias producen varias enzimas que pueden modificar la actividad del β -lactámico, entre los cuales podemos encontrar:

β -lactamasas de espectro ampliado (BLEA) pertenecientes al grupo 2b producen las enzimas TEM-1, TEM-2 y SHV-1; las cuales se expresan en bacterias gram negativas, capaces de hidrolizar la penicilina y ampicilina y levemente carbecilina o cefalotina; aunque no son capaces de hidrolizar las cefalosporinas o el aztreonam y son inhibidas por el ácido clavulánico (GREBO, 2010).

β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) de clase A tienen enzimas derivadas del grupo 2b como son: SHV-2 a SHV-6, TEM-3 a TEM-26 y CTX-M; las cuales hidrolizan cefalosporinas de amplio espectro, de tercera generación, antibióticos monobactámicos y puedan ser inhibidas por el ácido clavulánico (GREBO, 2010; García, 2013).

Estas cepas productoras de enzimas β -lactamasas representan un importante problema de salud pública, debido a su multirresistencia asociada a las penicilinas, las cefalosporinas de amplio espectro con una cadena lateral oximiina (cefotaxima, ceftriaxona y ceftazidima) y el oximino-monobactam aztreonam; la acción de estas enzimas puede ser inhibida por inhibidores de beta-lactamasas de tipo serina como sulbactam, clavulanato y tazobactam (Militza Guzmán & Alonso, 2013).

Los genes codificantes de enzimas tipo BLEE, se han detectado en diversas regiones a nivel mundial, particularmente en Europa y América del Sur, centrándose la propagación en los genes *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{KPC}* y *bla_{NDM}*, en plásmidos auto transferibles o conjugables de *E. coli* (García, 2013).

1.1.2. Cefalosporinas

El antibiótico cefalosporina se descubre en el año de 1948, por G. Brotzu en Cagliari-Italia, gracias al aislamiento de un hongo llamado *Cephalosporium acremonium*, cuyo extracto crudo mostraba acción bactericida frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos (GONZÁLEZ, 2013). En 1963 comenzó su aplicación clínica, cuando se logró la síntesis de cefalosporinas semisintéticas (Fernández, 2015).

Las cefalosporinas se clasifican clásicamente en "generaciones", en base al espectro de actividad antimicrobiana (Yaffe & Aranda, 2010).

➤ Las cefalosporinas de 1ª generación (C1G): son las más activas frente a la mayoría de los cocos Gram positivos aerobios (Artigas & Pueyo, 2008).

➤ Las cefalosporinas de 2^a generación (C2G): poseen menor actividad frente a los cocos y meticilino sensibles; pero son más activas frente a algunos Gram negativos (Alagarsamy, 2010).

➤ Las cefalosporinas de 3^a generación (C3G): son altamente activas contra productores de betalactamasas plasmídicas clásicas en Gram negativos; tienen una actividad variable frente a anaerobios (Sykes, 2014).

➤ Las cefalosporinas de 4^a generación (C4G): tienen un espectro extendido frente a Gram negativos y Gram positivos, teniendo una baja actividad frente a anaerobios. También son activas frente a cepas productoras de algunas betalactamasas de espectro ampliado, pero son hidrolizadas por otras enzimas. Su actividad frente a anaerobios es limitada (Frandsen & Smith, 2014).

1.1.3. Enzimas β -lactámicas

SHV

En la década de 1980, las cefalosporinas de tercera generación, también conocidas como oximino-cefalosporinas, las cuales eran resistentes a la acción de las betalactamasas circulantes, tomaron su acción clínica durante dicha época (Jiménez, Alvarado, Gómez, Carrero, & Fajardo, 2014). Sin embargo, en 1982 se aisló en Alemania la primera betalactamasa (SHV-2) producida por *Klebsiella pneumoniae* capaz de hidrolizar estos antibióticos (Shaikh, y otros, 2015).

El gen *bla_{SHV}* fue descrito en la familia Enterobacteriaceae, en el año 1970 en un aislado de *E. coli*, causando infecciones en la salud de las personas durante en las últimas décadas del siglo XX, que se originó a partir de una penicilinasa cromosómica; las β -lactamasas SHV actualmente abarcan una gran cantidad de variantes alélicas que incluyen β -lactamasas de espectro extendido y variantes no BLEE (Munita & Arias, 2016).

Las enzimas SHV han evolucionado de un espectro de actividad hidrolizante de estrecho a extenso, que incluye monobactámicos y carbapenémicos; por lo que se obtuvo como resultado cambios de aminoácidos que alteraron la configuración alrededor del sitio activo de las β -lactamasas (Liakopoulos, Mevius, & Ceccarelli, 2016).

Los aislados que producen enzimas de tipo SHV, muestran un antibiograma con resistencia a penicilina e inhibición por el ácido clavulánico (Munita & Arias, 2016). Hasta la actualidad,

se han descrito 194 variantes alélicas de SHV (Bush, Palzkill, & Jacoby, 2015), que han desarrollado resistencia a las cefalosporinas de tercera generación (Bush & Jacoby, 2010). Las β -lactamasas SHV se pueden dividir en tres subgrupos en función de las características moleculares o propiedades funcionales (Vera Manageiro, Caniça, & Bonnet, 2012):

- Subgrupo 2b (n=37): capaces que hidrolizar penicilinas y cefalosporinas tempranas (cefaloridina y cefalotina) y fuertemente inhibidas por ácido clavulánico y tazobactam.
- Subgrupo 2br (n=7): β -lactamasas de amplio espectro que adquirieron resistencia al ácido clavulánico.
- Subgrupo 2be (n=46): pueden hidrolizar una o más oxi-lactámicos β (cefotaxima, ceftazidima y aztreonam).

TEM

La enzima TEM es una de las familias de β -lactamasa mediada por plásmidos más comúnmente identificada dentro de bacterias Gram negativas (Yang, Li, & Bian, 2017). Además, tiene una fuerte capacidad de hidrólisis sobre los anillos β -lactámicos de penicilinas y las primeras cefalosporinas; ha demostrado una sorprendente plasticidad funcional en respuesta a la introducción de nuevos fármacos derivados de estos antibióticos (Salverda, Visser, & Barlow, 2010).

TEM fue descrito por primera vez en bacterias resistentes a la penicilina en 1963 y al pasar las décadas se fueron identificando más de 223 variantes modificadas (Bush, Palzkill, & Jacoby, 2015); y muchas de ellas difieren en el genotipo y fenotipo de resistencia (Török, Moran, & Cooke, 2017).

CTX

Una cefotaximasa mediada por un plásmido se identificó a partir de un aislado clínico de *E. coli* en Munich, Alemania; y se designó como CTX-M (Bush & Jacoby, 2010), en referencia a su actividad hidrolítica y la región en la que se encontró (Nordmann et. al, 2012). Durante los últimos años se han identificado al menos 172 variantes de CTX-M (Bush, Palzkill, & Jacoby, 2015). Los estudios epidemiológicos moleculares han revelado un vínculo estrecho e importante de genes *bla*_{CTX-M} con plásmidos, principalmente pertenecientes a los grupos de compatibilidad IncF, IncI, IncN, IncHI2, IncL / M e IncK (Song et al, 2011).

Las enzimas CTX-M han sido reconocidas como las más prevalentes entre la familia Enterobacteriaceae, la cual apareció en los años 90 en cepas de *E. coli*, proveniente de seres humanos sanos, ganado, animales de compañía, productos alimenticios y aguas residuales (Franz, Veenman, van Hoek, Husman, Blaak, 2015). Esta enzima, constituyen una familia BLEE de rápido crecimiento y dispersión con un alto impacto clínico (Zhao & Hu, 2013).

La propagación de las beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) de tipo CTX-M está relacionado a plataformas genéticas extremadamente movilizables que albergan genes *bla*_{CTX-M}, las cuales muestran la diseminación clonal y una frecuente asociación con genes que confieren resistencia a otras clases de antibióticos, como fluoroquinolonas y aminoglucósidos, que conducen a tasas elevadas de multirresistencia (Bajaj y otros, 2015).

Las carbapenemasas representan la familia más versátil de β -lactamasas, con una amplitud de espectro incomparable por otras enzimas que hidrolizan β -lactámicos; se llaman así, porque hidrolizan a la familia de betalactámicos conocidos como carbapenémicos (Alcala, 2015). Los antibióticos carbapenémicos inhiben el crecimiento de cepas BLEE, (Queenan & Bush, 2007). Las bacterias que producen estas β -lactamasas pueden causar infecciones graves en las que la actividad carbapenemasa hace que muchos β -lactámicos sean ineficaces (S.M.Diene & J.M.Rolain, 2014).

KPC

Las primeras carbapenemasas descritas fueron de bacilos Gram positivos; a diferencia de otras β -lactamasas conocidas en ese momento; estas enzimas son inhibidas por EDTA (Rao, 2012). Hasta principios de la década de 1990, todas las carbapenemasas se describieron como β -lactamasas codificadas cromosómicamente específicas de especie, cada una con un conjunto bien definido de características (Miriagou, 2012). Las tres familias principales de carbapenemasas están distribuidas de la siguiente forma:

➤ Clase A: según su filogenética pertenecen los grupos GES, KPC, SME, IMI y NMC-A. El mecanismo hidrolítico de estas enzimas requiere una serina en su sitio activa; estas enzimas tienen la capacidad de hidrolizar una amplia variedad de β -lactámicos como: penicilinas, cefalosporinas, aztreonam y carbapenémicos. Además, son inhibidas por el ácido clavulánico y el tazobactam (Monge, 2013).

➤ Clase B: incluyen en las familias VIM, IMP, GIM, SIM y NDM; el sitio activo de estas enzimas contiene un ión de Zn^{+2} , estas enzimas pueden hidrolizar todos los β -lactámicos

excepto el aztreonam (Bueno, 2015). No son inhibidas por el ácido clavulánico ni por el tazobactam, pero sí por agentes quelantes como el EDTA (I. Peña, 2016). Las bacterias que producen este tipo de enzimas son las que más impacto clínico producen (Alcalá, 2017).

➤ Clase D: Se pueden dividir en varios grupos según la homología OXA, los cuales se encuentran en especies como *Acinetobacter spp* y *K. pneumoniae*; la actividad hidrolítica de estas enzimas es débil, requiriendo de mecanismos adicionales de resistencia a imipenem y meropenem; por lo tanto, son susceptibles a las cefalosporinas de espectro extendido y a monobactámicos (Viña, 2015).

Teniendo todas estas, la capacidad de hidrolizar una amplia variedad de β -lactámicos, incluidos carbapenémicos, cefalosporinas, penicilinas y aztreonam; y todos son inhibidos por clavulanato y tazobactam, colocándolos en el subgrupo funcional del grupo 2 de β -lactamasas (Alcalá, 2017).

La enzima carbapenemasa de *K. pneumoniae* (KPC), se originó en un ambiente intrahospitalario, y de manera menos frecuente se aisló en *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter spp.*, y *Serratia spp.*; ésta KPC se anunció por primera vez en Carolina del Norte en 1996 (Mohan, y otros, 2015). Estos presentan una importante actividad hidrolítica frente a casi todos los antibióticos betalactámicos, y solo son inhibidas parcialmente por el ácido clavulánico y el tazobactam (Velásquez, et. al, 2013). Además, se diseminaron rápidamente a nivel mundial en la familia Enterobacteriaceae (Paul, y otros, 2015). Los genes *bla_{KPC}* y *bla_{NDM}* codifican la producción de enzimas KPC y NDM, respectivamente (Clinic, 2014).

NDM

El primer informe de la metalo-beta-lactamasa NDM, se produjo en Nueva Delhi, India en el año 2009, en una cepa *K. pneumoniae* (Resurrección et al., 2017). Los microorganismos NDM-positivos producen fenotipos de resistencia *in vitro* a todos los β -lactámicos, lo cual puede limitar las opciones terapéuticas (Rasheed, 2013). Además, los antibióticos que retienen actividad tienen altas tasas de efectos secundarios o tienen limitaciones en la administración de fármacos como colistina y fosfomicina (Paciel et al., 2011). La expresión *in vivo* de NDM puede no conferir resistencia clínica a todas las clases de cefalosporinas y carbapenemes (Zmarlicka, Nailor, & Nicolau, 2015).

Los microorganismos que producen NDM son capaces de transferir dichos genes, así como otros genes asociados a elementos genéticos móviles (Wei, Yang, Ye, & Li, 2015). Durante la transferencia genética vertical a través del tiempo, se ha ido generando mutaciones, las cuales han dado como resultado 13 variantes (Bush, Palzkill, & Jacoby, 2015).

La resistencia a antibióticos afectan a la gran mayoría de los géneros y especies de microorganismos y estos a su vez pueden ser transferidos al hombre desde el ambiente por diferentes vías como por ejemplo la cadena alimentaria; además, el uso de las heces como sistema de fertilización de los suelos y el uso de las aguas contaminadas para el regadío de los cultivos están implicados directamente con la contaminación a vegetales y el medio ambiente en general; en consecuencia el Codex alimentario constituyó un grupo de trabajo para tratar el tema relacionado con el uso de los antimicrobianos en los animales de consumo y la diseminación de las bacterias resistentes a través de los alimentos (Y. Peña, Espino, & Castillo, 2011).

1.1.4. Vegetales de estudio

Apio

El apio es un cultivo que florece todo el año y sus semillas pueden germinar de cinco a nueve años, tiene un ciclo de cultivo que va entre los 110 y 125 días; la temperatura mínima para que inicie su crecimiento es de entre 9°C y 10°C; sin embargo, su óptimo desarrollo se da entre los 18°C y 25°C (La Hora, 2015). El apio es cultivado en la provincia de Chimborazo y la zona de Imbabura (Narváez, 2012).

Lechuga

La lechuga cressa es una planta herbácea propia de las regiones semitempladas, la cual se cultiva con fines alimentarios y orientada al segmento de mercado gourmet, debido a su gran aceptación (Guanochanga & Betancourth, 2010). En los últimos años se ha cultivado bajo invernaderos para su exportación; en Ecuador hay 1.145 ha de lechuga con un rendimiento promedio de 7.928 kg por ha, según el Ministerio de Agricultura; del cual el 70 % es de lechuga criolla o seda, mientras el 30% es de variedades como la cressa o romana (Ledesma & Aguirre, 2011).

Según el Censo Nacional Agropecuario del Ministerio De Agricultura Y Ganadería Del Ecuador su distribución en la Sierra se encuentra en: Mira, Valle del Chota, Pimampiro,

Ibarra, Valle de Guayllabamba, San Antonio de Pichincha, El Quinche, Puembo, Machachi, Latacunga, Ambato - Huachi, Píllaro, Chambo, Penipe, Guamote, Azogues, Girón y Vilcabamba(Guanochanga & Betancourth, 2010).

Pimiento

El pimiento según el Censo Nacional Agropecuario la superficie de siembra de pimiento es de 1.145ha, sembrándose en la Costa y parte de la Sierra, en especial en las provincias de Guayas, Santa Elena, Manabí, El Oro, Imbabura, Chimborazo y Loja (Hiltunen, Virta, & Laine, 2017)

Cilantro

El cilantro en el Ecuador tiene un espacio productivo bastante amplio debido a sus características geográficas y climáticas adecuadas para su desarrollo, sembrándose por la mayoría de los agricultores de manera tradicional especialmente en hileras, como complemento al huerto familiar (Mena, 2013).

Se lo siembra en especial en la Sierra en las provincias de Imbabura, Pichincha, Chimborazo, Carchi, Tungurahua y Bolívar, teniendo una producción durante todo el año. Se utiliza las hojas, semillas, tallos y raíces; además, es muy consumida como condimento en la preparación de las comidas, ensaladas, embutidos y encurtidos, así como en la medicina para reducir la flatulencia, trastornos gastrointestinales, entre otros usos (Mena, 2013).

Perejil

El perejil es una planta herbácea umbelífera bianual que se cultiva por sus hojas. Se radican en la región sierra, en provincias tales como Loja, Chimborazo, Bolívar, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi y Tungurahua (Quintana, 2013).

Tomate

El tomate riñón ocupa el cuarto lugar en importancia por área sembrada dentro del cultivo de hortalizas en Ecuador (Basantés, 2015). La mayoría de tomateras está ubicada en la provincia de Santa Elena y en los valles de Azuay, Chimborazo, Imbabura y Carchi y tiene una temperatura óptima para el crecimiento que oscila entre 21° y 27° C (Gema Alexandra López & Heredia, 2013).

1.1.5. Mercados de Ibarra

Según los datos analizados del INEC en el 2010, el sector de servicios es el más representativo a nivel cantonal con el 58.02%, con sus principales actividades de “comercio al por mayor y menor”, enseñanza, administración pública y transporte; el sector de industrias que representa el 19.38%, está relacionado con las principales actividades en la industria manufacturera que está ubicada en el casco urbano y tiene el principal tipo de ocupación que es el de ser empleado privado, y la otra actividad que es en la construcción; y el sector agropecuario representa el 11.61%, que está relacionado con las actividades agrícolas, ganaderas, silvicultura y pesca, actividades que no se realizan en el área urbana y en sus zonas periféricas (INEC, 2010).

Dentro de la ciudad de Ibarra existen algunos mercados donde se comercializan vegetales de consumo crudo, entre los principales se encuentran el mercado Mayorista, el mercado Amazonas y mercado Santo Domingo (La Hora, 2004).

El mercado Mayorista está ubicado en las avenidas 13 de abril y Jaime Roldos Aguilera. Es un espacio público donde pequeños y grandes productores realizan el comercio de vegetales (Figura 2). Para los microproductores, los miércoles, sábados y domingos, pueden usar las instalaciones del centro de compras, con el objeto de que vendan sus productos al consumidor final. Los lunes y jueves desde las 00h00, hasta las 03h00 del siguiente día es el momento adecuado para que quienes quieren comprar al por mayor. Los martes, viernes y miércoles, desde las 05h00, son las ventas al por menor (La Hora, 2004).

El mercado Amazonas ubicado en la Avenida Alfredo Perez Guerrero y Sanchez y Cifuentes, es donde se comercializa distintas clases de productos a los consumidores finales. Teniendo un horario de atención de lunes a domingo de 08h00 hasta las 18h00 (La Hora, 2004).

El mercado Santo Domingo está ubicado en la calle Manuelde la Chica Narváez y José Mejía Lequerica. Es uno de los mercados donde se comercializa frutas, verduras y comidas en una ordenada y remodelada instalación, que cuenta con servicios de parqueadero, vigilancia de policías municipales y rigurosos controles sanitarios. Su horario de atención es de lunes a sábado de 10h00 hasta las 20h00 (El Norte, 1016).

1.2. MARCO LEGAL

La elaboración del presente documento se sustenta en leyes vigentes y establecidas de acuerdo con la Constitución de la República del Ecuador del año 2008.

1.2.1 Constitución de la República del Ecuador del año 2008

Derechos del buen vivir

Art. 13.- Las personas y colectividades tienen derecho al acceso seguro y permanente a alimentos sanos, suficientes y nutritivos; preferentemente producidos a nivel local y en correspondencia con sus diversas identidades y tradiciones culturales.

Art. 14.- Se reconoce el derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir, *sumak kawsay*.

Sección cuarta

Art. 25.- Las personas tienen derecho a gozar de los beneficios y aplicaciones del progreso científico y de los saberes ancestrales.

Sección séptima

Art. 32.- La salud es un derecho que garantiza el Estado, cuya realización se vincula al ejercicio de otros derechos, entre ellos el derecho al agua, la alimentación, la educación, la cultura física, el trabajo, la seguridad social, los ambientes sanos y otros que sustentan el buen vivir.

Art. 74.- Las personas, comunidades, pueblos y nacionalidades tendrán derecho a beneficiarse del ambiente y de las riquezas naturales que les permitan el buen vivir.

Art. 281.- La soberanía alimentaria constituye un objetivo estratégico y una obligación del Estado para garantizar que las personas, comunidades, pueblos y nacionalidades alcancen la autosuficiencia de alimentos sanos y culturalmente apropiado de forma permanente.

Art. 358.- El sistema nacional de salud tendrá por finalidad el desarrollo, protección y recuperación de capacidades y potencialidades para una vida saludable e integral, tanto individual como colectiva, y reconocerá la diversidad social y cultural. El sistema se guiará por los principios generales del sistema nacional de inclusión y equidad social, y por los de bioética, suficiencia e interculturalidad, con enfoque de género y generacional.

Art. 360.- El sistema garantizará, a través de las instituciones que lo conforman, la promoción de la salud, prevención y atención integral, familiar y comunitaria, con base en la atención primaria de salud; articulará los diferentes niveles de atención; y promoverá la complementariedad con las medicinas ancestrales y alternativas.

Art. 385.- El sistema nacional de ciencia, tecnología, innovación y saberes ancestrales, en el marco del respeto al ambiente, la naturaleza, la vida, las culturas y la soberanía, tendrá como finalidad:

1. Generar, adaptar y difundir conocimientos científicos y tecnológicos.
2. Recuperar, fortalecer y potenciar los saberes ancestrales.

Fines de la Educación Superior

Art. 5.- Derechos de las y los estudiantes. - Son derechos de las y los estudiantes los siguientes:

a) Acceder, movilizarse, permanecer, egresar y titularse sin discriminación conforme sus méritos académicos.

b) Acceder a una educación superior de calidad y pertinente, que permita iniciar una carrera académica y/o profesional en igualdad de oportunidades.

c) Contar y acceder a los medios y recursos adecuados para su formación superior; garantizados por la Constitución.

d) Participar en el proceso de evaluación y acreditación de su carrera.

e) Elegir y ser elegido para las representaciones estudiantiles e integrar el cogobierno, en el caso de las universidades y escuelas politécnicas.

f) Ejercer la libertad de asociarse, expresarse y completar su formación bajo la más amplia libertad de cátedra e investigativa.

1.3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido al volumen de antimicrobianos empleados en actividades humanas, las cepas que están expuestas a dosis sub-inhedorias de antibióticos de uso clínico, generan cierta resistencia a los mismos (Marshall y Levy, 2011; Szmolka y Nagy, 2013). Estudios por la OMS muestran que 80% del consumo total de antibióticos de importancia médica se da en el

sector agropecuario (OMS, 2014). De esta manera, la presión selectiva antibiótica, permite que cepas bacterianas con múltiples mecanismos de resistencia de importancia clínica se mantengan y evolucionen en el medio ambiente (Szmolka y Nagy, 2013; Taylor et al., 2011).

El problema se agrava cuando estos microorganismos expresan genes de resistencia a múltiples antimicrobianos, convirtiendo el ambiente en un reservorio de bacterias multirresistentes de difícil erradicación (Rivera et al., 2015). Estudios han detectado enterobacterias resistentes a BLEE en Asia, África, Europa y América provenientes de enterobacterias de hospedadores humanos y animales, como de carnes, vegetales, de medio ambiente e incluso de aves migratorias (Casana, 2017).

Las enfermedades infecciosas tanto del sistema respiratorio como del sistema digestivo constituyen el 40% de las consultas médicas (Rosadas et al., 2015). En un estudio realizado en el hospital Eugenio Espejo se determinó que el 13.96% de las infecciones fueron causadas por *E. coli* BLEE, ocasionando así la mortalidad intrahospitalaria en un 23.02% y morbilidad en un 52.38% durante el año 2015 (Parra & Rivera, 2015).

Algunos estudios en diferentes localidades de Ecuador muestran su presencia y su relación con las infecciones de difícil tratamiento en la comunidad (Ortega et al., 2018). En el caso de una infección por *E. coli* BLEE, es posible que, debido a su resistencia, no respondan a los tratamientos estándar, provocando una enfermedad prolongada y con un mayor riesgo de muerte (Da Silva GJ, 2012).

1.4. JUSTIFICACIÓN

Dentro del grupo de bacterias con resistencia a antibióticos, se encuentra *E. coli*, siendo ésta un modelo de investigación para las enterobacterias Gram negativas entéricas. Por ello es considerada como un microorganismo centinela, principalmente por ser un huésped común en animales, incluido el ser humano. Además, puede de ser causante de infecciones intestinales y extraintestinales y presentar altos niveles de resistencia. Las infecciones causadas por *E. coli* BLEE, son resistentes a cefalosporinas de tercera generación (C3G), siendo antibióticos de uso intrahospitalario. Estas cepas registran altas tasas de morbilidad y mortalidad, así como elevados costos de tratamiento.

Este estudio, propone a los vegetales como el primer objeto de estudio de la presencia de *E. coli* BLEE en la ciudad de Ibarra. Ya que los vegetales representan un medio óptimo de diseminación bacteriana, por ser alimentos que se consumen generalmente crudos, en

ensaladas y salsas. Esto permite que la carga bacteriana presente sea mayor, facilitando la colonización de los consumidores. Los vegetales, adicionalmente, presentan evidencia de contaminación originada de Unidades Productivas Agropecuarias, UPAs (agua y suelo), en los cuales son producidos, siendo especialmente importantes a la hora de rastrear el origen de este tipo de contaminación y dirigir los esfuerzos para limitar su dispersión.

1.5. PREGUNTA DIRECTRÍZ DE INVESTIGACIÓN

¿Existe presencia de *Escherichia coli* BLEE en los vegetales de consumo crudo comercializados en Ibarra?

1.6. OBJETIVOS

1.6.1. Objetivo general

Caracterizar aislados de *Escherichia coli* productores de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) obtenidos a partir de vegetales crudos comercializados en la ciudad de Ibarra.

1.6.2. Objetivos específicos

1. Determinar la presencia de *Escherichia coli* BLEE en productos vegetales destinados al consumo en Ibarra.
2. Identificar la presencia de genes de resistencia tipo BLEE en las cepas aisladas y su relación clonal.
3. Socializar la problemática de la resistencia bacteriana a antimicrobianos en la comunidad ibarreña.

1.7. HIPÓTESIS

En la ciudad de Ibarra se comercializa vegetales (apio, culantro, lechuga, pimiento, perejil y tomate riñón) para consumo humano, que contienen *Echerichia coli* productoras de β -lactamasas de Espectro Extendido.

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1. Descripción del área de estudio

Se tomó en cuenta 3 mercados (Amazonas, Mayorista y Santo Domingo) de la ciudad de la Ibarra (Figura 1), ubicada a $0^{\circ}21'46''N$ $78^{\circ}07'48''O$, con una superficie total de 41km^2 y una población de 131 856 habitantes (INEC, 2010).



Figura 1. Mapa de la localización del cantón Ibarra – Ecuador. **Recuperado de:** https://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Imbabura_-_Ibarra.png

2.2. Muestreo de los vegetales en los mercados anteriormente mencionados

Se realizó un muestreo por conveniencia considerando los puestos de venta más centrales en cada uno de los 3 mercados principales de la ciudad de Ibarra (Figura 2), el cual consistió en tomar 3 muestras de cada vegetal (apio, culantro, lechuga, perejil, pimiento, tomate) durante 3 semanas consecutivas en un puesto específico. Las muestras fueron manipuladas con asepsia y el uso de guantes para evitar contaminación (Otzen & Manterola, 2017; Torres



Figura 2. Toma de muestras vegetales en los mercados de Ibarra

& Martinez, 2013).

Cada muestra, fue colocada en fundas independientes con su respectiva etiqueta, para evitar su posible contaminación con los otros vegetales y se almaceno a una temperatura de 6°C (Torres & Martinez, 2013).

2.3. Encuestas realizadas a expendedores y consumidores

Se realizaron 60 encuestas, usando un muestreo por conveniencia según el vegetal, para evaluar algunos parámetros sobre la procedencia del producto y las costumbres del expendedor con respecto a limpieza asepsia del puesto de venta (Anexo 1).

Se encuestó de forma manual a 150 consumidores de los mercados (Figura 3), para evaluar el conocimiento en la comunidad respecto a la resistencia microbiana a antibióticos, tomando como base la encuesta realizada por la OMS en el Semana Mundial de Concienciación sobre el Uso de los Antibióticos en el año 2017 (Anexo 2). El tamaño de muestra se calculó usando la ecuación 1. Se consideró un tamaño de población de 131856, una confianza del 95%, y un error permisible de 8%.

$$n = \frac{z^2 * p * q * N}{e^2 * (N - 1) + (z^2 * p * q)}$$

Donde:

N = Población total

z = Valor distribución normal nivel de confianza

p = Probabilidad de éxito

q = Probabilidad de fracaso

e = Error permisible



Figura 3. Encuesta hacia consumidores de los vegetales dentro de los mercados de Ibarra

2.4. Procesamiento de las muestras vegetales

Se autoclavó 5 L de agua destilada para realizar las diluciones y lavado del filtro. Se pesó 150 g de cada muestra obtenida, seleccionando las partes que se encuentren en mejor estado de conservación de cada vegetal, ya que estas partes son las que ingiere el consumidor. Se colocó cada una de las muestras en los matraces erlenmeyer con 250ml de agua peptonada (Liofilchem ®) (Figura 4), se agitó durante 30 minutos para que los microorganismos se desprendan del vegetal (Pérez, 2015).



Figura 4. Desprendimiento de los microorganismos adheridos a las muestras vegetales

Se procedió a filtrar las muestras, utilizando un filtro de celulosa de 0.45 μm en el vaso de la bomba de vacío (Roker 410 ®) (Figura 5), con diluciones de 0.1 ml, 1 ml, 10 ml y se aforó a 100 ml con agua destilada autoclavada cada una de las muestras. Para el cambio de filtración vegetal, se realizó un proceso de limpieza el cual consistió en colocar el vaso de filtrado 5 minutos en hipoclorito de sodio, posteriormente se lo paso a 5 minutos en alcohol etílico al 70% y finalmente lavado con agua destilada (Figura 6) (Ortega et al., 2018).



Figura 5. Muestras vegetales en agua peptonada para desprender los microorganismos adheridos a la superficie



Figura 6. Proceso de limpieza del filtro para cambiar la filtración del vegetal

El filtro fue colocado en la caja de medio de cultivo MacConkey (BD TM®) con Cefotaxima (Genfar®) a una concentración de 3µg/ml y etiquetado respectivamente. Posteriormente, se procedió a incubar las cajas con filtros a 37°C durante 24 horas.

2.6. Aislamiento de cepas

Pasado el tiempo de incubación, se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFCs) mediante el uso del estereoscopio (Figura 7) tomando en cuenta la apariencia de color



Figura 7. Conteo de colonias mediante el uso del estereoscopio rosado, propia para *Escherichia coli* (Gutiérrez et al., 2015).

Se tomaron de 1 a 3 colonias de cada caja dependiendo del crecimiento que haya existido en cada filtro (Figura 8), tomando en cuenta la morfología característica de *E. coli* y también se aislaron otras bacterias al azar, con el fin de identificar otros grupos bacterianos. Estas bacterias se las sembró mediante la técnica de desgaste en cajas de MacConkey con antibiótico hasta obtener una cepa pura (Figura 9) y se dejó en incubando a 37°C durante 24 horas (Bastidas, 2018; Arana et al., 2013). Posteriormente, las cepas obtenidas fueron enviadas para su identificación mediante Maldi-Tof.



Figura 8. Crecimiento de cepas obtenidas de las disoluciones filtradas



Figura 9. Aislamiento de cepas con morfología de interés

Se preparó 1.5 g de TSB (Liofilchem ®) en 50 ml de agua destilada. En un tubo de 2 ml se colocó 600 µl de TSB más 400 µl de glicerol, y se procedió a colocar la cepa pura (Figura 10), después se homogenizó la muestra etiquetándola respectivamente y por finalmente se colocó en la congeladora a - 80°C, constituyendo el cepario del proyecto (Burguet, Sierra, &



Figura 10. Criopreservación de las cepas puras para posteriores estudios

Brito, 2012).

2.7. Confirmación de la producción de β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE)

La confirmación de la producción BLEE se realizó mediante la prueba de doble disco utilizando los antibióticos en discos (BD®) de: Cefotaxima (CTX), Acido clavulámico (CAZ/CLA), Ceftazidima (CAZ) y Cefoxitina (FOX) en medio de cultivo Mueller Hilton (Almanza, 2017).

Se esterilizaron en seco hisopos de algodón, luego que estuvieron fríos, se tomaron de una o dos colonias de cada cepa y se lo introdujo en un tubo con caldo TSB, homogenizando el cultivo. El tubo se lo colocó en un densitómetro (bioSan ®) para medir la densidad óptica (Figura 11) en la escala de McFarland 0.5 (Chiribiga & Araujo, 2012).



Figura 11. Medición de densidad óptica en la escala de MacFarland 0.5

Con el mismo hisopo se esparció la cepa en todas direcciones cubriendo en su totalidad la superficie de la caja petri con Mueller Hinton (BD®). Con ayuda de una pinza estéril se colocó los discos de antibiótico a una distancia de 2 cm unos de otros (Figura 12). Finalmente, las cajas se incubaron por 24 h a 35°C y se procedió a medir el halo de inhibición (García, García, Hernández, Ruiz, & Yagüe, 2011).

El mecanismo de resistencia BLEE se evaluó estadísticamente mediante una prueba de independencia y contingencia χ^2 , valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos, es decir que las categorías en las cuales fueron agrupadas presentaban una influencia en la respuesta de resistencia. Los datos fueron agrupados considerando el mercado en el cual fue muestreado y el tipo de vegetal evaluado.

2.8. Extracción de ADN de las cepas aisladas

Se tomó con el aza la cepa pura en abundante cantidad y se colocó en un tubo 1 ml de agua destilada pura. Se homogenizó la muestra con ayuda del vortex (Labnet ®) y se centrifugó durante 1 minuto a 14000 rpm para lavar la muestra y quitar los residuos de Agar (BIOTED, 2018).

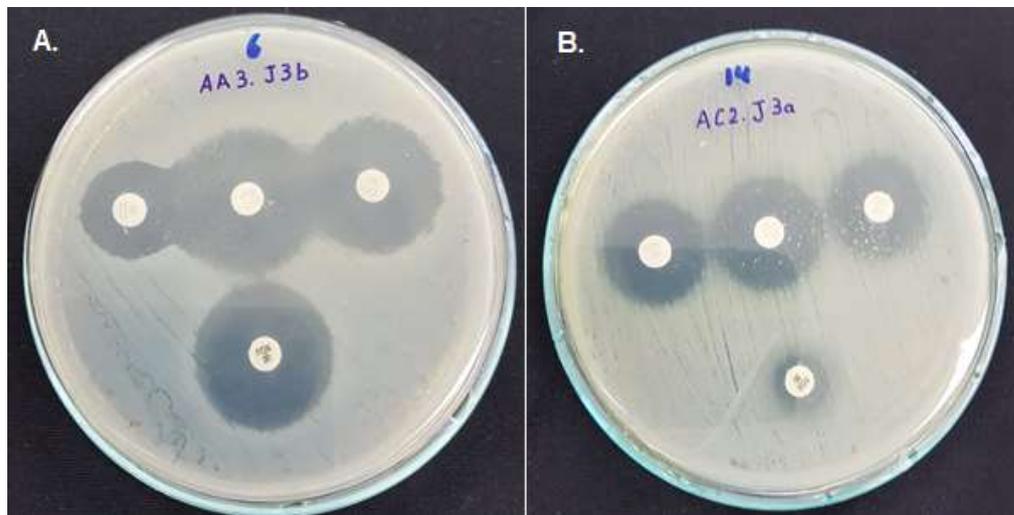


Figura 12. Prueba de doble disco para la identificación de BLEE. A. Cepa con resistencia a BLEE positivo. B. Cepa con resistencia a BLEE negativo.

Posteriormente, se desechó el sobrenadante en un frasco con hipoclorito al 3%. Se repitió una vez más el proceso de lavado (Figura 13). Se colocó 500 μ l de agua destilada pura en el tubo con la muestra tratada, se homogenizó y se colocó en el termobloque (Labnet ®) a 96°C durante 10 minutos. luego se centrifugó durante 10 minutos a 14000 rpm y se recuperó el sobrenadante que contiene el ADN de la cepa en otro tubo previamente etiquetado (Fraga, et al., 2004).



Figura 13. Proceso de extracción de ADN

2.9. Identificación molecular de las cepas aisladas

2.9.1. Electroforesis

Para la preparación del tampón Tris-Boro-EDTA 10x (Figura 14), usando EDTA (Invitrogen ®), Tris Base (Invitrogen ®) y ácido bórico (Bioland®) (Igem, 2013). Se preparó el gel de agarosa (Invitrogen®) al 1% con tampón TBE (1x) y se colocó 3.5 μ l de SYBR Safe (Invitrogen®), homogenizando la mezclar (Smith, 2015).

Se vertió la preparación en la cubeta de electroforesis colocando la peñilleta permitiendo su polimerización en oscuridad durante 15 minutos. Una vez sólido, se retiró la peñilleta y la



Figura 14. Preparación de TBE

cubeta con el gel de agarosa fue colocado dentro de la cámara de electroforesis. Se llenó la cámara de electroforesis con solución tampón TBE (1x) hasta cubrir por completo el gel de agarosa (Edvotek, 2010).

En un pedazo de parafilm se colocó 2 μ l de colorante Blue (6x) (Promega®) y se añadió 5 μ l de ADN de las muestras de interés, homogeneizando con la micropipeta (7 μ l); en el primer pocillo del gel de agarosa se colocó 2 μ l del marcador de peso molecular ADN de 1 Kb (abm®), en los siguientes pocillos se colocó 7 μ l de las muestras de ADN y finalmente se colocó el control negativo que consistió en colorante + agua (Hierro, 2014). La fuente de potencia (Labnet®) fue programada a: 115 V, 50 minutos y 300 A. Una vez finalizado el proceso (Figura 15), se procedió a revelar el gel en el transiluminador (Clever®)

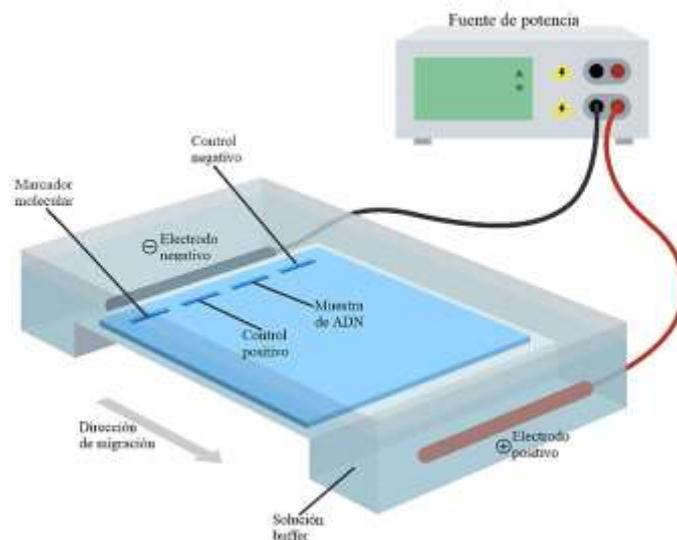


Figura 15. Descripción de las partes de electroforesis

fotodocumentando el resultado (Jimenez, 2017).

2.9.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se preparó en un tubo de capacidad de 0.2 ml, la solución madre (1x) para reacciones con un volumen final de 20 μ l, utilizando: 10 μ l de la polimerasa comercial GoTaq® Green Master Mix, 10 pmol de primer (eurofins®) Forward (cebador 1) (Tabla 1), 10pmol de primer Reverse (cebador 2), se añade 5 μ l de ADN de la muestra y aforado con agua destilada estéril; como control negativo de utilizó agua, se tapó bien los tubos de las muestras y se procedió a colocarlos en el termociclador (SimpliAmp®) (Tabla 2) (Dorado, 2006; Espinosa, 2007).

Posteriormente se realizó el proceso de electroforesis cargando directamente las muestras en los pocillos, con las condiciones descritas previamente. Finalmente, los resultados fueron revelados en el transiluminador y fotodocumentados (Figura 16).



Figura 16. Fotodocumentación del gen de electroforesis

Tabla 1.

Secuencia de cebadores usados para la identificación de genes BLEE

<i>Gen</i>	<i>Forward (5'to 3')</i> <i>Reverse (5'to 3')</i>	<i>Temperatura de Anillamiento (°C)</i>	<i>Referencia bibliográfica</i>
CTX – 1	F: CCCATGGTTAAAAAATCACTGC R: CAGCCGCCTTTTGCCGTCTAAG	57	
CTX – 2	F: ATGATGACTCAGAGCATTTCG R: TGGGTTACGTTTTTCGCCGC	59	
CTX – 8	F: TGATGAGCATCGCGTTAAG R: TAACCGTCGGTGACGATTTT	59	
CTX – 9	F: AAAAGGATCCTTGGGTTGCTCTC TGTGG R: AAAGGATCCCGATCAACAAAAC CAG	55	
SHV	F: GGTTATGCGTTATATTCGCC R: TTAGCGTTGCCAGTGCTC	59	(Ortega, Barba, & Zurita, 2016)
TEM	F: ATAAAATTCTTGAAGACGAAA R: GACAGTTACCAATGCTTAATC	59	
MCR-1	F: CGGTCAGTCCGTTTGTTTC R: CTTGGTCGGTCTGTAGGG	60	
NDM	F: GCATTAGCCGCTGCATTGAT R: GGAATGGCTCATCACGATCA	59	
KPC	F: TGTCACTGTAGTCGCCGTC R: CTCAGTGCTCTACGAAAACC	60	

Tabla 2.

<i>Protocolo de PCR</i>	<i>programación</i>		
	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
	Denaturación inicial	94	5.0
	Denaturación cíclica	94	0.5
	Anillamiento cíclico	Variable	0.5
	Extensión cíclica	72	1.0
	Extensión final	72	10.0
	Conservación	4	∞
N° de repetición de ciclos: 30x			

2.9.3. PCR palindrómica extragénica repetitiva basada en BOX-A1R

Se usó BOX-PCR para identificar la clonalidad de *E. coli* presente en los vegetales de estudio tomados de los principales mercados de la ciudad de Ibarra. Las mezclas para una reacción (1x) se realizó en un volumen de 25µL consistiendo en 3µL de ADN, 50 pmoles del primer BOX-A1R (TACGGCAAGGCGACGCTGACG), 2 mM de MgCl₂ (Promega®) y aforando con agua destilada estéril hasta completar el volumen final; como control negativo se usó agua (Carlos, et al.,2012). Posteriormente, se colocó las muestras en el termociclador (Tabla 3).

Tabla 3.

Protocolo de programación de BOX-PCR

	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
	Denaturación inicial	95	7
	Denaturación cíclica	94	1
	Anillamiento cíclico	56	1
	Extensión cíclica	53	1
	Extensión final	65	16
	Conservación	4	∞
N° de repetición de ciclos: 35x			

Posteriormente se realizó el proceso de electroforesis en gel de agarosa al 1% cargando directamente las muestras en los pocillos y se corrieron a 100V durante 70 minutos; posteriormente se visualizó en transiluminador y se fotodocumentó (Carlos et al., 2012). El patrón de bandas se analizó usando el módulo Fingerprint Data del programa bioNumerics v.7 (Figura 17).

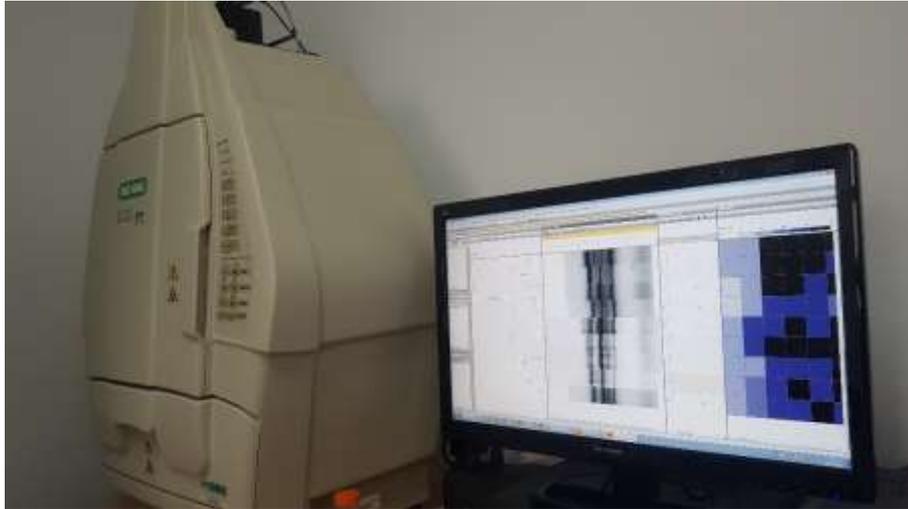


Figura 17. Análisis del resultado de BOX-PCR con las cepas de *E. coli* en el programa bioNumerics v.7

2.10. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en el proceso experimental fueron analizados con el programa SPSS v.22 mediante tablas de contingencia. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos. No se realizaron pruebas de normalidad ni de homogeneidad de varianzas.

Para la evaluación de los resultados de la encuesta se utilizó estadística descriptiva. Se realizaron diagramas circulares y se comparó las respuestas con la encuesta de la OMS.

Para comparar la clonalidad de los aislados se calculó el índice de dispersión de Simpson para comparar la clonalidad de los aislados de *E. coli* analizados mediante la técnica de tipaje BOX-PCR (Hunter & Gaston, 1988; Sobral et al., 2011).

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS

3.1. Muestreo y aislamiento de bacterias

Del muestreo se obtuvieron un total de 60 vegetales entre los tres mercados estudiados en la ciudad de Ibarra. Luego del filtrado por diluciones, 60 filtrados presentaron crecimiento bacteriano resistentes al antibiótico; los cuales, pertenecieron a 35 diferentes muestras vegetales (Figura 18).

Analizando la presencia de bacterias por filtrados, podemos observar que el mercado 1 presentó la mayor cantidad de aislados resistentes. La prueba de Chi cuadrado demostró contingencia entre la presencia de bacterias resistentes y el mercado donde fue tomada la muestra ($\chi^2 = 32.98$; $gl = 2$; $p \leq 0.001$), obteniendo 35 filtrados resistentes en el mercado 1 (Figura 18).

De la misma forma, se encontró contingencia entre el tipo de vegetal y la resistencia bacteriana ($\chi^2 = 20.32$; $gl = 5$; $p = 0.001$). El perejil presentó mayor cantidad de aislados resistentes con un total de 14 cultivos bacterianos resistentes (Figura 19).

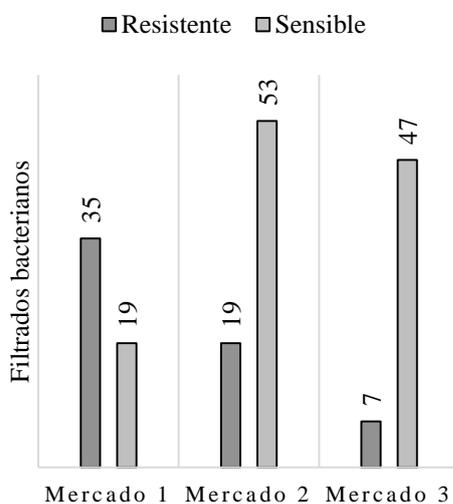


Figura 18. Aislados de bacterias resistentes a cefotaxima según los mercados (n = 180)

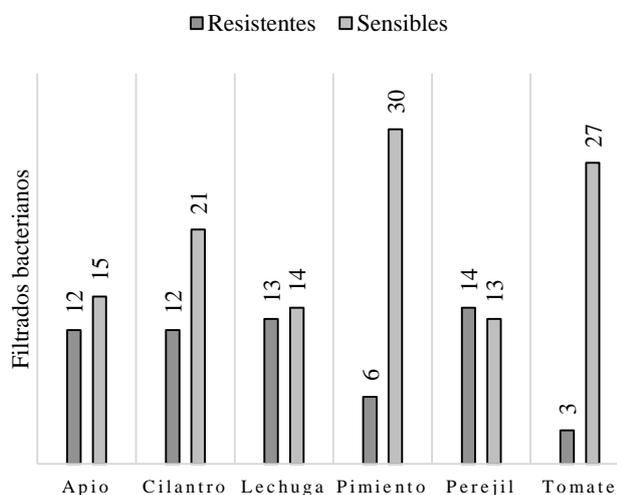


Figura 19. Aislados de bacterias resistentes a cefotaxima según los vegetales (n = 180)

De los 60 filtrados se recuperaron 61 aislados de bacterias resistentes, dentro de las cuales se tomaron 30 colonias con la morfología característica de *E. coli* y 31 colonias pertenecientes a otras bacterias.

3.2. Aislados productores de BLEE

Luego de obtener cepas resistentes a cefotaxima, mediante la prueba de doble disco, se identificó la producción de BLEE en 31 de los 61 aislados (Figura 20). Se evidenció que no existen pruebas suficientes para demostrar la contingencia entre la producción de BLEE y el mercado ($\chi^2 = 1.39$; $gl = 2$; $p = 0.498$). Por otro lado, existe contingencia entre la presencia de cepas BLEE y el vegetal ($\chi^2 = 12.75$; $gl = 5$; $p = 0.013$), evidenciando mayor presencia de este tipo de cepas en muestras de apio (14 aislados) (Figura 21).

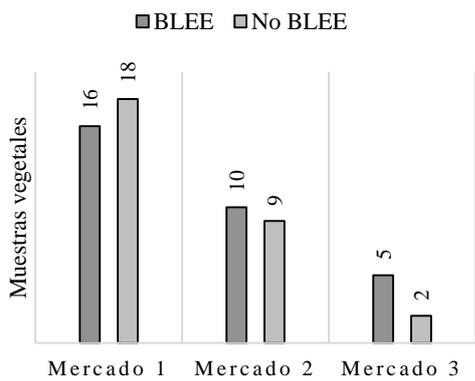


Figura 20. Cantidad de muestras vegetales que presentaron bacterias productoras de BLEE (n = 60)

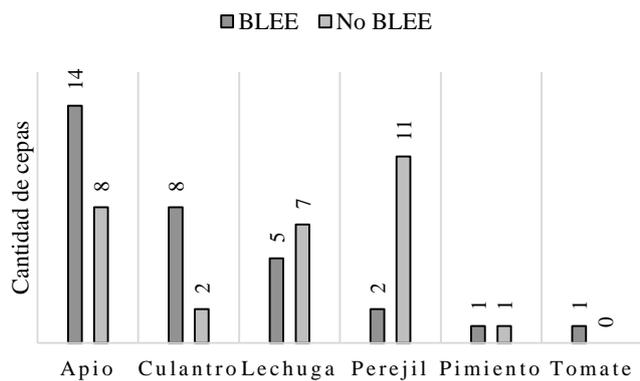


Figura 21. Identificación de cepas productoras de BLEE según el vegetal (n = 61)

Posteriormente, en el análisis realizado por Maldi-Tof, permitió conocer la identidad de los aislados (Figura 22). Mostrando la existencia de contingencia entre la producción de BLEE y el tipo de bacteria ($\chi^2 = 27.82$; $gl = 5$; $p \leq 0.001$), encontrándose 14 cepas de *E. coli* BLEE.

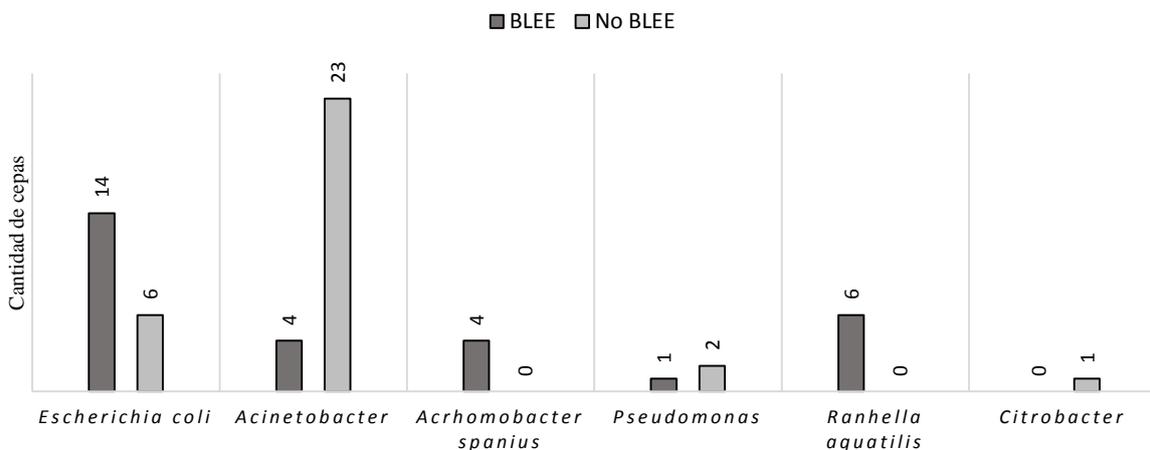


Figura 22. Identificación de la identidad de las bacterias resistentes a C3G y la producción de BLEE

3.3. Identificación de genes de estudio

Se identificaron 23 cepas que presentaron al menos uno de los genes estudiados, de las cuales 8 cepas pertenecen a la especie de *E. coli* (Tabla 4). El gen con mayor prevalencia entre las cepas analizadas es *bla*_{CTX-M} del grupo 1 (7 aislados), seguido del grupo 9 (4 aislados) y en menor cantidad el grupo 8 (2 aislados).

Tabla 4.

Identificación de variantes de los genes encontrados

Nº	BACTERIA	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{NDM}	<i>mcr-I</i>
21	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	55				
27	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	55				
31	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>					1.1
33	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>					1.1
35	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>		1			
36	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>					1.1
3	<i>Acrhomobacter spanius</i>	8		2		1.1
32	<i>Acrhomobacter spanius</i>		1			
43	<i>Acrhomobacter spanius</i>			2	4	1.1
44	<i>Acrhomobacter spanius</i>			2		1.1
16	<i>Escherichia coli</i>	55				
17	<i>Escherichia coli</i>	55-65				
18	<i>Escherichia coli</i>	65				1.1
24	<i>Escherichia coli</i>	55				
37	<i>Escherichia coli</i>					1.1
45	<i>Escherichia coli</i>	8				
62	<i>Escherichia coli</i>	65				
63	<i>Escherichia coli</i>	55-65				
39	<i>Ranhella aquatilis</i>			2		1.3
41	<i>Ranhella aquatilis</i>			2		
46	<i>Ranhella aquatilis</i>				9	1.3

3.3.1. Análisis filogenético

Los perfiles electroforéticos generados por BOX-PCR distinguieron 14 patrones clonales diferentes, lo que representa un índice de diversidad de Simpson (HGDI) de 0.91. Tomando en cuenta los polimorfismos generados entre los 20 aislamientos de *E. coli*, se observó 4 grupos clonales homólogos; 2 grupos con 3 patrones iguales y 2 grupos con 2 patrones (Figura 23).

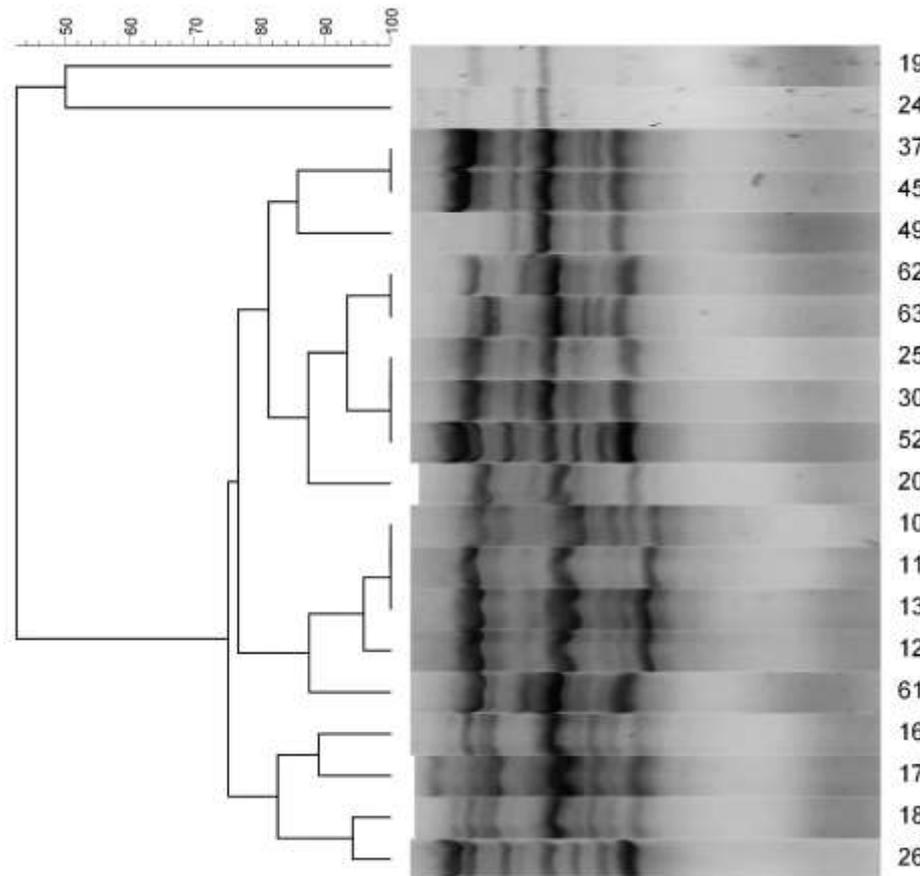


Figura 23. Dendrograma del análisis clonal de las cepas de *E. coli* aisladas

3.4. Encuestas a expendedores

En las 60 encuestas realizada a expendedores de los mercados de Ibarra, se obtuvo como resultado que el 85% de puestos de venta no realizan ningún protocolo de limpieza (Figura 24).

Con respecto a la procedencia de los vegetales se puede evidenciar (Figura 25) que en un 36% de los expendedores dentro de los tres mercados abastecen sus productos de un centro de acopio.

El abastecimiento de los productos vegetales hacia los mercados se realiza en un 63% diariamente (Figura 26). Además, se evidenció que la mayor producción de los vegetales se genera durante todo el año (Figura 27).

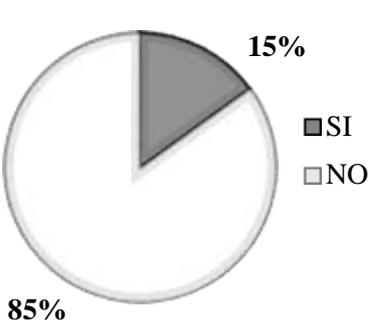


Figura 24. Limpieza del sitio de venta

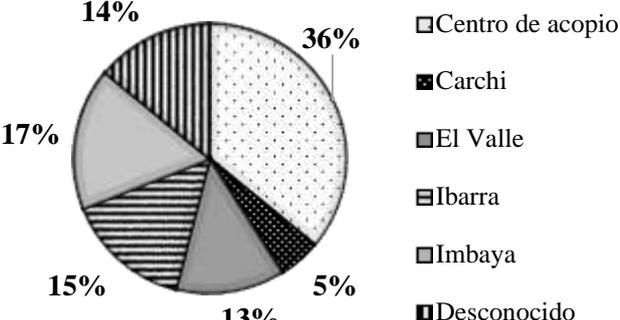


Figura 25. Procedencia de los vegetales

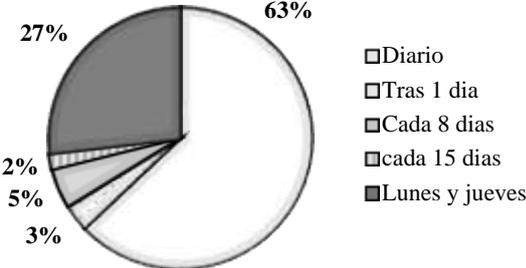


Figura 26. Abastecimiento de productos

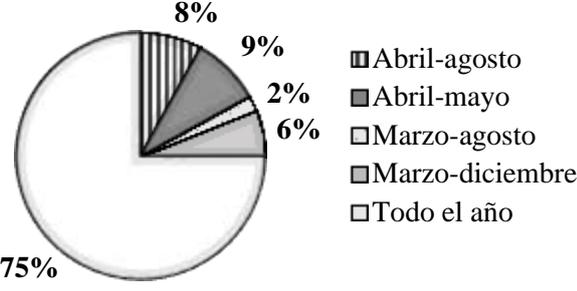


Figura 27. Tiempo de producción de vegetales

3.5. Encuestas a los consumidores

En la población ibarreña se encuestó a 150 personas de 19 a 68 años de edad entre hombres y mujeres. Los encuestados manifiestan un desconocimiento con respecto a la función de los antibióticos, ya que en un 55% respondió que sirven para matar todos los microbios, cuando en realidad solo sirven para combatir bacterias (Figura 28).

Con respecto a la pregunta 2 sobre la transmisión de bacterias (Figura 29), se evidencia que un 72% de las personas conoce sobre los medios de transmisión de bacterias resistentes a

antibióticos. Además, los encuestados manifiestan en un 70% terminar los tratamientos con antibióticos (Figura 30).

La pregunta 4 sobre las consecuencias de contraer infecciones resistentes a antibióticos, los encuestados supo revelar en un 59%, que las consecuencias pueden ser estar más tiempo enfermo, ser hospitalizados y administrarse medicación más costosa (Figura 31).

El 45% de los encuestados opinan que se puede hacer algo con respecto a la resistencia microbiana que incrementa al pasar el tiempo, siendo esta la respuesta correcta (Figura 32).

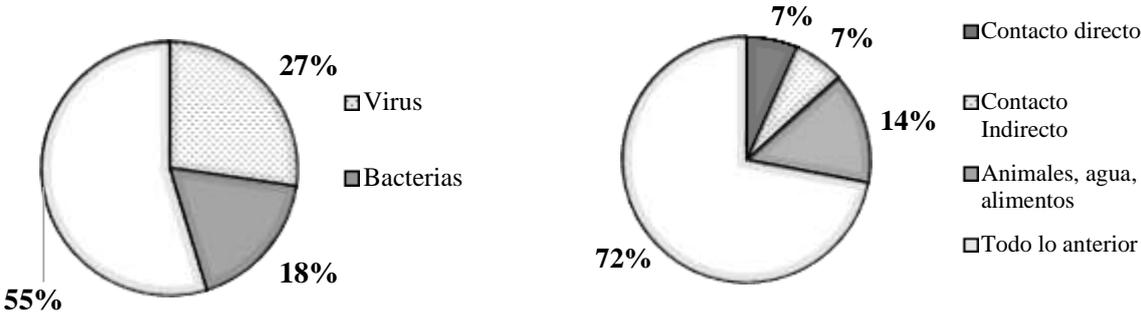


Figura 28. Pregunta 1: ¿Los antibióticos son medicamentos potentes que matan?

Figura 29. Pregunta 2: Las bacterias resistentes a los antibióticos pueden transmitirse al ser humano

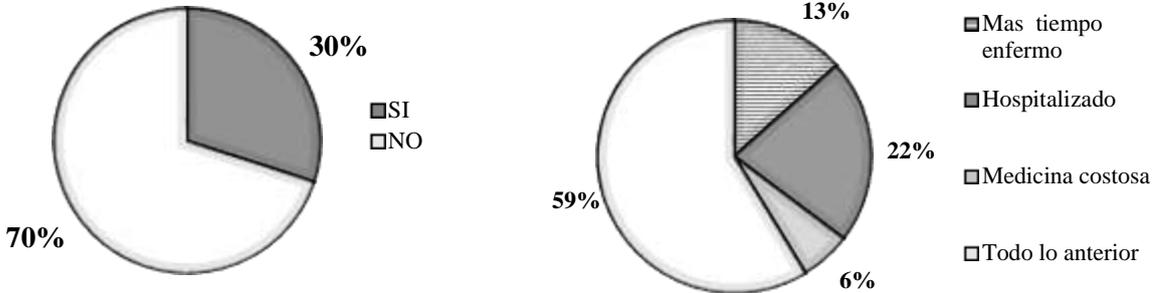


Figura 30. Pregunta 3: Se debe dejar de tomar antibióticos en cuanto ya se siente mejor

Figura 31. Pregunta 4: ¿Qué puede ocurrir si contraigo una infección resistente a los antibióticos?

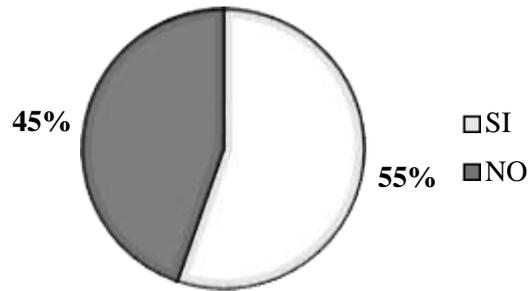


Figura 32. Pregunta 5: La resistencia a los antibióticos ya está descontrolada y la situación es cada vez peor. Yo no puedo hacer nada.

Para ayudar a combatir la resistencia bacteriana ante los antibióticos los encuestados señalan en un 58% que mantiene sus vacunas al día (Figura 33). Además, en un 79% reconoce a *E. coli* como una bacteria peligrosa para la salud humana (Figura 34).

Existe un 79% de conciencia sobre la existencia bacterias que son resistentes a antibióticos en los vegetales que se consumen (

Figura 35). Por lo que se ve relacionada con la pregunta 9, la cual respondieron en su totalidad que es necesario lavar los vegetales antes de consumirlos. También manifestaron en un 67%, que los vegetales que se cultivan para el comercio dentro de los mercados de la ciudad son seguros para la salud humana (Figura 36).

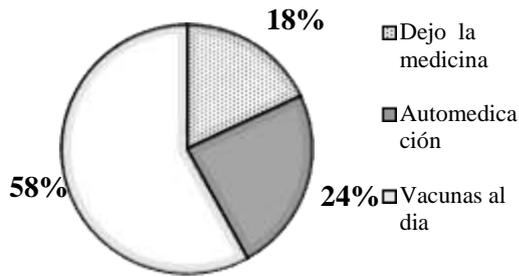


Figura 33. Pregunta 6: Puedo ayudar a detener la resistencia a los antibióticos si

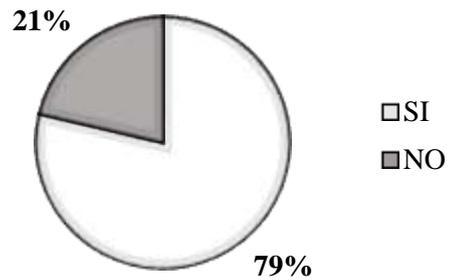


Figura 34. Pregunta 7: *E. coli* es una bacteria patógena que siempre es peligrosa para la salud.

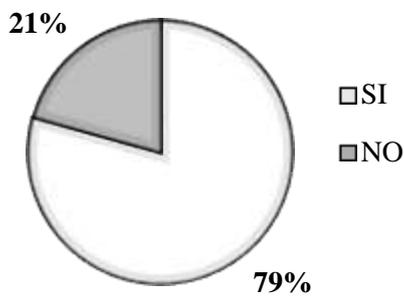


Figura 35. Pregunta 8: Los vegetales que consumimos pueden tener bacterias resistentes a los antibióticos

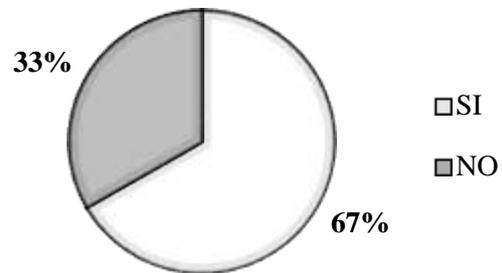


Figura 36. Pregunta 10: Piensa que los productores y distribuidores de verduras entregan alimentos seguros para la salud.

Para la evaluación de la encuesta, se tomaron en cuenta los criterios de respuestas de la encuesta sobre resistencia antimicrobiana de la OMS, sumando las respuestas correctas e incorrectas (Figura 37), dando como resultado que la población ibarreña en un 51% conoce respecto a la problemática de la resistencia antimicrobiana.

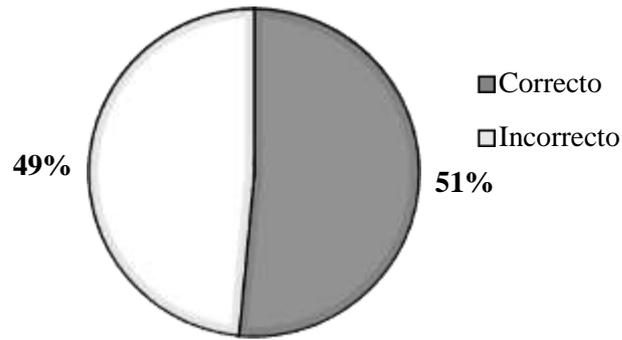


Figura 37. Evaluación de la encuesta sobre el conocimiento de resistencia antimicrobiana

CAPÍTULO IV

4. DISCUSIÓN

Los datos obtenidos de los vegetales muestreados en los 3 mercados de Ibarra, muestran que existe una importante presencia de bacterias resistentes a C3G (58.33%), y que en su mayoría se identificó a *Acinetobacter calcoaceticus*. y *E. coli*. Estudios en Francia, donde se analizó vegetales y frutas, el 13% portaba bacterias productoras de BLEE (Ruimy et al.,

2010). De igual manera, en Valencia evidencia que el 50% de muestras fueron positivas a especies bacterianas resistentes a antibióticos en productos vegetales que se consumen crudos (Falomir, Rico, & Gozalbo, 2013). Existiendo un mayor porcentaje de bacterias resistentes en nuestro estudio que en otros estudios realizados en Europa.

Los productores de frutas y hortalizas orgánicas de Europa deben cumplir con las normas de “Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria” (EFSA), que prohíbe la fertilización por agentes químicos, pero permiten el uso de estiércol en la agricultura orgánica y aguas residuales previamente tratadas (Ruimy et al., 2010). En cambio, en Ecuador no existe mucha regularización con respecto a la normativa de producción orgánica ecológica-biológica, siendo el 82.66% de agricultores que desconoce de estas normativas y el uso correcto de agroquímicos (Vizcaíno & Betancourt, 2017). Entre el 50.03% - 78.24% de los agricultores, usan insumos químicos y estiércol de ganado al que ha sido administrado medicamentos y/o promotores de crecimiento (FAO & OMS, 2005; INEC, 2016). Lo que provoca que dosis sub-inhedorias de antibióticos entren en contacto con bacterias del medio y generen cierta resistencia hacia antimicrobianos (Estévez, 2016). Esta podría ser la razón por la cual se evidenció la prevalencia de microorganismos resistentes a antibióticos, figurando un posible reservorio de resistencia en los vegetales estudiados y representando un potencial riesgo de diseminación hacia los consumidores.

El número de bacterias resistentes recuperados en cada mercado muestra una mayor cantidad de aislados resistentes a C3G en el Mercado 1 (35 cepas), mientras que el Mercado 3 (7 cepas) presento una menor cantidad de este tipo de bacterias. En la encuesta realizada a los expendedores de vegetales en los diferentes mercados de Ibarra, se evidencia que en su mayoría (85%) no usan protocolos de limpieza, por lo que existe una mayor contaminación dentro de los mercados 1 y 2, en comparación con el mercado 3, donde se aplica en mayor proporción estos procedimientos. Estudios realizados muestran que los países en vías de desarrollo utilizan menor bioseguridad en las plantas de producción alimentaria y en el manejo de los residuos, por lo que existe el riesgo tanto de transmisión directa como indirecta. En el caso de los países desarrollados, la transmisión indirecta es la predominante (Cansa, 2017; OPS/OMS, 2014). Por ello, los posibles patógenos al encontrar pocas barreras y condiciones óptimas pueden multiplicarse y generar contaminación directa por contacto entre alimentos contaminados o indirecta a través de las manos del expendedor que toca el alimento crudo contaminado y, a continuación con otro producto listo para la venta (Pelayo, 2019). Es

posible que este fenómeno esté ocurriendo en los mercados 1 y 2, ya que la encuesta a los expendedores pone en evidencia la insuficiencia de protocolos de limpieza, razón por la cual se evidenció la cantidad de microorganismos observados en cada mercado. Además, esto puede estar relacionada con una inadecuada manipulación de los alimentos e infraestructura ineficiente.

Para medir el conocimiento el conocimiento sobre la resistencia microbiana en los consumidores, los encuestados mencionaron en un 18% que los antibióticos sirven para matar bacterias. Finalmente, el 51% respondieron correctamente a la encuesta realizada. Por otro lado, en un estudio realizado en Perú, el 44.6% opinó que servían para matar bacterias y en general existió un conocimiento el 50% en cuanto al uso adecuado de los antibióticos (González, 2017). Mientras que, el 36% de encuestados en España que piensa equivocadamente que los antibióticos. Esto posiblemente se deba al nivel de educación que existe en la población sobre lo que es la resistencia antimicrobiana, cómo se genera y a la conciencia sobre el uso correcto de antibióticos.

La presencia de crecimiento bacteriano resistente a C3G fue menor en el caso del pimiento (3.33%) y tomate (1.6%), cuyas plantas se desarrollan con tallos elevados, restringiendo el contacto directo con el suelo, a diferencia de vegetales considerados herbáceas que crecen a nivel de suelo, donde se encontró porcentajes más altos (apio 6.66%, cilantro 6.66%, lechuga 7.22%, perejil 7.77%). Estas herbáceas pueden tener un mayor contacto con las aguas y fertilizantes contaminados con enterobacterias resistentes a antibióticos (Chacón et al., 2010; Gema Alexandra López & Heredia, 2013). En Holanda, en un estudio realizado en hortalizas de cultivo orgánico y convencional, se encontró que la contaminación con bacterias fecales resistentes a C3G se presentaron con mayor frecuencia en hortalizas de raíz y bulbos en un 4.4%, y con menor frecuencia en hortalizas de tallo en un 1.6% y en hojas verdes en un 0,6% (Hoek et al., 2015). Los investigadores, en ese estudio, sugirieron que existe una relación entre el tipo de vegetal cultivado y la cantidad de microorganismos encontrados, dependiendo de la cercanía de estos con el suelo, lo que podría explicar las diferencias encontradas en el porcentaje de bacterias encontradas entre los vegetales aquí estudiados.

Al analizar el número de aislados BLEE recuperados de cada mercado, se evidenció que el mercado 1 presenta la mayor cantidad de esta clase de microorganismos en muestras de apio, cilantro y lechuga. También, en un estudio realizado en Quito, se detectó *E. coli* productora de BLEE en muestras de alfalfa, lechuga, perejil y cilantro comercializados en un mercado en

esta ciudad, siendo la alfalfa, lechuga y perejil los vegetales con mayor presencia de esta bacteria (David Ortega et al., 2018). Estos resultados sugieren la circulación de microorganismos productoras de BLEE en productos vegetales distribuidos para la comercialización nuestro medio y que se da con mayor incidencia en vegetales de hojas que crecen cercanas al suelo.

El análisis molecular de las cepas de *E. coli* identificó las variantes CTX-M-55 (2/20), CTX-M-65 (2/20) y CTX-M-8 (1/20), de las cuales 2 cepas poseían coexistencia de CTX-M-55 y -65; además, 2 cepas expresaron el gen *mcr-1*. Ninguna mostró la presencia de TEM, SHV, KPC ni NDM. En Corea del Sur se analizó carne de pollo obteniendo un total de 67 cepas de *E. coli* BLEE consiguiendo *bla*_{CTX-M-65} (35/67), *bla*_{CTX-M-55} (17/67), *bla*_{TEM-1} (21/67), *bla*_{TEM-116} (15/67), y *bla*_{TEM-135} (1/67), en algunos casos la misma cepa tenía la variantes de CTX-M 55 y 65; en tanto *bla*_{SHV} no registró ninguna presencia (Park, Kim, Ryu, & Jeon, 2019). Por otro lado, en una empresa avícola de Filipinas se obtuvo cepas de *E. coli* BLEE, de las cuales se reconoció *bla*_{CTX-M-8} (15/69), *bla*_{SHV} (19/69) y *bla*_{TEM} (46/69) (Gundran, Cardenio, Villanueva, Sison, & Benigno, 2019). Además, en Japón se investigó la prevalencia y características de los aislados de *E. coli* BLEE en cárnicos porcinos, donde se aisló 22 cepas de las cuales se identificó las variantes: *bla*_{CTX-M-15} (12/22), *bla*_{CTX-M-55} (6/22), *bla*_{CTX-M-3} (2/22) y *bla*_{CTX-M-14} (2/22), pero no se encontró ninguna cepa que posea el gen TEM ni SHV (Norizuki et al., 2017). En cuanto a la presencia del gen de resistencia a colistina, *mcr-1*, un estudio realizado en China, a partir de muestras de lechuga y tomate, se obtuvo 7/26 aislamientos de *E. coli* productora de *mcr-1* (Bonacorsi, Clermont, & Bingen, 2000). También, en granjas avícolas en Argentina, de 129 pollos se aisló 149 cepas de *E. coli* positivos para *mcr-1* con las variantes *mcr-1.1* y *mcr-1.5*, que además, portaban BLEE (5/10, *bla*_{CTX-M-2} o *bla*_{CTX-M-14}) (Dominguez et al., 2019). Con respecto a las variantes encontradas en nuestro estudio (CTX-M 55 y 65) y la bibliografía de otros lugares, se evidencia que son las más frecuentes en alimentos; en tanto a la variante CTX-M-8 es más escaso. En tanto al gen *mcr-1.1*, existe una alta prevalencia en los vegetales como se evidenció en nuestro estudio y también se encuentra presente en cárnicos como se menciona en los estudios anteriormente descritos.

Se encontró, asimismo, cepas de *E. coli* fenotípicamente positivas para la producción de BLEE, que en el análisis molecular no evidenciaron ningún gen estudiado de esta clase. Esto posiblemente se debe a que pueden producir otras enzimas BLEE menos prevalentes como

son: PER, VEB, BES, GES, TLA y SFO pertenecientes grupo funcional 2be, al igual que algunas enzimas de la familia OXA que suele presentar sensibilidad disminuida a cefepima, manteniéndose la sensibilidad a C3G. Otras del subgrupo 2ber son las betalactamasas CMT (complex mutant TEM) que combinan una cierta resistencia a la inhibición por el ácido clavulánico junto a una mayor actividad frente a oximino-cefalosporinas (Cano et al., 2007; Navarro, Calvo, Cantón, & Fernández, 2011).

En Ecuador, es el primer estudio que identifica la presencia de *Acinetobacter calcoaceticus* con los genes productores de β -lactamasas de espectro extendido *bla*_{CTX-M-55} y *bla*_{SHV-1b}. La especie *A. baumannii*, es la más común expresando genes BLEE en aislados de muestras clínicas y ambientales. Un estudio epidemiológico molecular realizado en Argentina identificó genes de CTX-M del grupo 2 y 9 en *Acinetobacter* spp., *E. cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. enterica* y *S. marcescens* (Zhao & Hu, 2013). En un estudio que analizó muestras hospitalarias de Puerto Rico, se observó β -lactamasas de tipo TEM, SHV, CARB, CTX-M, SCO, PER, VEB, GES y KPC en cepas de *Acinetobacter* spp., identificando a *A. baumannii* como productor de SHV-1b y *A. calcoaceticus* productor de KPC-2, -3, -4 y -10 (Robledo et al., 2010; Zhao & Hu, 2012). En nuestro estudio se encontró *A. calcoaceticus* portadora de KPC-2.

El agua, suelo, alimentos congelada y cárnicos son nichos de *Acinetobacter*. Estos microorganismos pueden sobrevivir en superficies secas, mayormente que *E. coli* y *Pseudomonas* spp (Duque, 2013). Un estudio demostró una mayor prevalencia de infecciones por *Acinetobacter* spp. en el agua por su facilidad para transmitirse (Duque, 2013; Luis, Narváez, & Ortega, 2014; Zuleima, Vegasa, & Nieves, 2005). La posible presencia de plásmidos adicionales, puede ser el resultado de varios eventos de transferencia genética a lo largo de su evolución, que le permite adquirir o perder plásmidos con capacidad de dispersarse y mantenerse en bacterias de distinto género y/o especie (Salto, 2017). Por lo mencionado anteriormente, se puede evidenciar en nuestro estudio la presencia de cepas de *A. calcoaceticus* con genes de resistencia BLEE comúnmente encontrados en *E. coli* y otras enterobacterias.

En las 4 cepas de *Achromobacter spanius* se identificó *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{KPC-2}, *bla*_{NDM-4}, *bla*_{SHV-1b} y *mcr-1.1*, de las cuales existió 3 cepas con coexistencia entre *bla*_{KPC-2} y *mcr-1*. En cultivos de zanahoria en Caldas-Colombia, se identificó 32 aislados, siendo el 37.5% *Stenotrophomonas* sp., seguido de géneros como *Bacillus*, *Achromobacter* y *Rhizobium*, cada

uno con el 18,8 % de representación. (Gaviria, Galeano, Restrepo, & Hernández, 2018). En tanto la especie *Achromobacter spanius* ha sido identificada en ambientes hospitalarios, pantanos y medio ambiente agrícola, ya que, tienen diferentes actividades promotoras del crecimiento de las plantas, como resistencias a estrés múltiple, degradación de celulosa, actividad fosfatasa alcalina y proteasa alcalina (Abod, Laslo, Szentes, & Lányi, 2019; Coenye, Vancanneyt, Falsen, Swings, & Vandamme, 2003; Wass et al., 2019). En pacientes de China se describió cepas de *Achromobacter* spp que producían *mcr-1* de las variantes .1, .2, .3, .4 y .5 (Pedersen, Olesen, Jensen, Nørskov, & Wang, 2017). No se encontró estudios moleculares con respecto a la producción de BLEE en esta especie, sin embargo, es posible que por la transferencia horizontal, selección y co-selección de genes de resistencia estos microorganismos sean reservorios de determinantes genéticos de resistencia antimicrobiana, con el riesgo potencial que esto representa para la salud humana y animal (Cana, 2017).

El total de los aislados *Rahnella aquatilis* (6 cepas), presentó características fenotípicas de producción de BLEE en la prueba de difusión de doble disco, pero no se identificó la presencia de los genes BLEE aquí estudiados. En Países Bajos, se identificó cepas con resistencia a C3G en siete tipos de vegetales que se consumen crudos: apio, zanahoria, achicoria, escarola, lechuga, champiñones y rábano. Se recuperó 59/90 aislamientos de *Rahnella aquatilis* productora de BLEE y, mediante secuenciación, se observó que todos los aislados tenían genes *bla_{RAHN}*, siendo la variante *bla_{RAHN-1}* la más prevalente que el gen *bla_{RAHN-2}* en un 1.7% (Blaak et al., 2014). *Rahnella aquatilis* es una bacteria que se puede encontrar en el agua, en suelos, vegetales, heces humanas, animales y alimentos. Tiene resistencia natural a ampicilina, cefalosporinas de primera y segunda generación y cefoxitina, gracias al gen constitutivo tipo BLEE *bla_{RAHN}* que posee; además, presenta resistencia intrínseca a amoxicilina-ácido clavulánico y fosfomicina. En un estudio realizado en Argentina, en el que analizaron 72 aislamientos clínicos y ambientales de *R. aquatilis*, que también mostraban una sensibilidad intermedia a cefotaxima y ceftriaxona, pero no a ceftazidima ni imipenem (Lopardo, 2016; Stock, Gröger, & Wiedemann, 2016). Por otro lado, se identificó 3 cepas de *Rahnella aquatilis* que presentaron las carbapenemasas KPC-2 y NDM-9, además del gen *mcr-1.3*. No encontramos estudios que hayan descrito la presencia y/o co-existencia de NDM-9 y resistencia a colistina en *R. aquatilis* en vegetales. En un estudio en China, donde se encontró cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* en productos cárnicos que poseían los genes BLEE *bla_{NDM-1}*, *bla_{NDM-4}*, *bla_{NDM-5}*, *bla_{NDM-9}*, así como *mcr-1*; además, se observó la co-existencia de *mcr-1* y *bla_{NDM-9}* en cepas de *E. coli* (Zhang et al., 2018).

Nuestros resultados demuestran la co-existencia de *mcr-1.3* y *bla_{NDM-9}* en *R. aquatilis*, aunque como se evidencia en el estudio anterior esta combinación es más típica en *E. coli* y *K. pneumoniae*. La variante *mcr-1.3* ha sido detectada en (5,11%; 58/1136) aislados de *E. coli* de origen de pollo en 13 provincias en China (Gene et al., 2017).

Con respecto al análisis de clonalidad mediante BOX-PCR entre las cepas de *E. coli*, se evidenció que existe una amplia diversidad clonal (14 filotipos) entre las 20 cepas estudiadas. Mediante el método de tipificación, que distingue entre cepas no relacionadas y determina el número de tipos existentes en un grupo (Hunter & Gaston, 1988; Sobral et al., 2011). Esto descarta la existencia de una sola fuente de contaminación en el ambiente, indicando varios posibles reservorios de *E. coli* resistente a C3G, siendo también, un potencial riesgo de diseminación de estos microorganismos de importancia clínica a través del consumo de vegetales a la comunidad.

CAPÍTULO V

5.1. Conclusiones

Al finalizar el estudio se concluye que en la ciudad de Ibarra se comercializan vegetales con presencia de cepas de *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro. Además, se

encontró otras especies de microorganismos resistentes a C3G como *Acinetobacter*, *Achromobacter* y *Ranbella*.

En la identificación de especies bacterianas mediante Maldi-Tof se concluye que existe una alta presencia de *Acinetobacter*, principalmente en el mercado 1, ya que todas las cepas que presentaron genes de resistencia proceden de este lugar.

De acuerdo con la evaluación de las encuestas realizadas se evidencia que la población Ibarreña un conocimiento insuficiente en cuanto al uso adecuado de los antibióticos, así mismo, se evidencia un mal uso de los antibióticos por parte de la población encuestada.

Los genes BLEE más prevalentes fueron *bla_{CTX-55}* y *bla_{CTX-65}*, concordando con otras literaturas sobre resistencia ambiental. Además, también se encontró una alta prevalencia del gen *mcr-1*, el cual es resistente a colistina.

Se evidenció una significativa presencia de genes de resistencia en microorganismos catalogados como ambientales. Evidenciando la necesidad de realizar estudios más profundos acerca del resistoma ambiental.

Existe una amplia variedad clonal entre las cepas que se encuentran diseminadas en el ambiente y a su vez llevan una similitud del 93% en cepas de *E. coli* encontradas en este estudio.

5.2 Recomendaciones

Para evitar la infección por esta clase enterobacterias resistentes a antibióticos, se recomienda lavar muy bien los vegetales antes de consumirlos, de ser posible usar agua caliente ya que estas bacterias sobreviven hasta una temperatura de 50°C.

De igual forma se sugiere a la comunidad Ibarreña tener mesura al momento de usar los antibióticos y no automedicarse; esto nos ayudará a prevenir la resistencia antimicrobiana.

Se sugiere educar a la población estudiada, la problemática existente sobre la resistencia a antibióticos y el uso correcto de los antibióticos.

Se aconseja analizar en estudios posteriores, la clonalidad existente de otras especies de bacterias. Se puede incluir un análisis epidemiológico, como la técnica MLST (*Multilocus sequence typing*), para lograr identificar clones epidemiológicos.

Se recomienda futuros estudios para tratar de identificar la fuente o procedencia de este tipo de contaminación. Así mismo, es importante estudiar los elementos genéticos móviles presentes en los alimentos para entender su epidemiología e implementar métodos para reducir su presencia.

CAPÍTULO VI

5. ANEXOS

6.1. Anexo 1. Encuesta a expendedores de los vegetales en los puestos de venta de los tres mercados de Ibarra.

Código: _____

Producto: _____

Procedencia: _____

Frecuencia de abastecimiento: _____

Mayor producción: _____

Limpieza: _____

6.2. Anexo 2. Encuesta a consumidores de los vegetales en los tres mercados de la ciudad de Ibarra.

1.- Los antibióticos son medicamentos potentes que matan:

- Los virus
- Las bacterias
- Todos los microbios

2.- Las bacterias resistentes a los antibióticos pueden transmitirse al ser humano:

- Por contacto con alguien que tenga una infección resistente a los antibióticos.
- Por contacto con algo que haya tocado una persona que tenga una infección resistente a los antibióticos (por ejemplo, en centros sanitarios con una higiene deficiente, las manos de los profesionales sanitarios o los instrumentos que utilizan).
- Por contacto con animales vivos, alimentos o agua portadores de bacterias resistentes a los antibióticos.
- Todo lo anterior.

3.- Se debe dejar de tomar antibióticos en cuanto ya se siente mejor.

- Verdadero
- Falso

4.- ¿Qué puede ocurrir si contraigo una infección resistente a los antibióticos?

- Puedo estar enfermo más tiempo.
- Es posible que tenga que consultar al médico más veces o que tenga que ser hospitalizado.
- Puede que necesite medicamentos más caros con más efectos colaterales.

Todo lo anterior.

5.- La resistencia a los antibióticos ya está descontrolada y la situación es cada vez peor. Yo no puedo hacer nada.

Verdadero

Falso

6.- Puedo ayudar a detener la resistencia a los antibióticos si:

Dejo de tomarlos cuando me sienta mejor.

Los tomo en cuanto empiece a sentirme enfermo, tanto si los obtengo en la farmacia como si me los da un amigo.

Mantengo mis vacunaciones al día.

7.- E. coli es una bacteria patógena que siempre es peligrosa para la salud

Verdadero

Falso

8.- Los vegetales que consumimos pueden tener bacterias resistentes a los antibióticos

Verdadero

Falso

9.- Es necesario lavar los vegetales antes de consumirlos

Verdadero

Falso

10.- Piensa que los productores y distribuidores de verduras entregan alimentos seguros para la salud

Verdadero

Falso

BIBLIOGRAFIA

- Abod, É., Laslo, É., Szentes, S., & Lányi, S. (2019). *Plant Growth-Promoting Bacteria: Strategies to Improve Wheat Growth and Development Under Sustainable Agriculture*. India: Springer Nature.
- Alcala, M. M. de Z. (2015). *Carbapenemasas: un mecanismo de resistencia bacteriana frente a las carbapenemas, antibioticos de ultimo recurso*. Complutense de Madrid.
- Almanza, D. Á. (2017). Identificación de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias Identification of extended spectrum β -lactamases in enterobacterias. *Habanera de Ciencias Médicas*, 9(4), 516–524.
- Alzamora, S., Guerrero, S., Nieto, A., & Vidales, S. (2004). Manual de conservación de frutas y hortalizas mediante tecnologías combinadas. Retrieved from FAO website: <http://www.fao.org/3/y5771s/y5771s02.htm>
- Arana, I., Orruño, M., & Barcina, I. (2013). *Como Abordar Y Resolver Aspectos Prácticos De Microbiología. 2*. Retrieved from https://ocw.ehu.eus/file.php/48/Tema_2._Metodos_basicos_de_enumeracion_de_microorganismos.pdf
- Bastidas, C. A. (2018). *Guia para practicas de laboratorio microbiologia*. 1–38.
- BIOTED. (2018). Extracción ADN bacteriano. *Bioted*, (C), 1–4. Retrieved from <http://bioted.es/protocolos/EXTRACCION-ADN-BACTERIANO.pdf>
- Blaak, H., Hoek, A. H. A. M. Van, Veenman, C., Leeuwen, A. E. D. Van, Lynch, G., Overbeek, W. M. Van, ... Husman, D. R. (2014). International Journal of Food Microbiology Extended spectrum β -lactamase- and constitutively AmpC-producing Enterobacteriaceae on fresh produce and in the agricultural environment. *International Journal of Food Microbiology*, 168–169, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.006>
- Bonacorsi, P., Clermont, O., & Bingen, E. (2000). Rapid and Simple Determination of the Escherichia coli Phylogenetic Group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4555–4558. Retrieved from edouard.bingen@rdb.ap-hop-paris.fr
- Bueno, J. (2015). *Epidemiología molecular de enterobacterias productoras de carbapenemasas*. Retrieved from <https://zaguan.unizar.es/record/47451/files/TAZ-TFM-2015-161.pdf>
- Burquet, N., Sierra, N., & Brito, L. (2012). Conservación de cepas microbianas por el método de liofilización para el control microbiológico en Laboratorios Liorad. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 43(3), 1–4. Retrieved from <http://revista.cnice.edu.cu/revistaCB/sites/default/files/articulos/CB-3-2012-151-154.pdf>
- Carlos, C., Alexandrino, F., Stoppe, N. C., Sato, M. I. Z., & Ottoboni, L. M. M. (2012). Use of Escherichia coli BOX-PCR fingerprints to identify sources of fecal contamination of water bodies in the State of São Paulo, Brazil. *ELSEVIER*, 93(1), 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.08.012>
- Casana, C. (2017). *El uso de antibioticos en la industria alimentaria y su contribucion al*

desarrollo de resistencias determinantes de la diseminación de la resistencia a la colistina. Complutense de Costa Rica.

- Castanheira, M., Deshpande, L. M., Mills, J. C., Jones, R. N., Soave, R., Jenkins, S. G., & Schuetz, A. N. (2016). *Klebsiella pneumoniae* Isolate from a New York City Hospital Belonging to Sequence Type 258 and Carrying bla KPC-2 and bla VIM-4. *60*(3), 1924–1927. <https://doi.org/10.1128/AAC.01844-15>.Address
- Chiribiga, M., & Araujo, C. (2012). *Nuevo Método alternativo para la detección de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en Escherichia coli y Klebsiella spp.* Central del Ecuador.
- Coenye, T., Vancanneyt, M., Falsen, E., Swings, J., & Vandamme, P. (2003). *Achromobacter insolitus* sp. nov. and *Achromobacter spanius* sp. nov., from human clinical samples. *Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1819–1824. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02698-0>
- Correa, C., Castro, E., Salamanca, D., Bustacara, L., & Lemos, E. (2017). *Escherichia Coli* productora de Nueva Delhi metalo- β -lactamasa en Colombia: reporte de caso. *Infectio*, *21*(2), 132–134. <https://doi.org/10.22354/in.v21i2.658>
- Diep, T. T., Nguyen, N. T. N., Nguyen, T. N. C., An, H. K., Nguyen, T. Q., Nguyen, V. H., ... Nguyen, L. T. P. (2015). Isolation of New Delhi metallo- β -lactamase 1-producing *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strain carrying ctxA, st and hly genes in southern Vietnam. *Microbiology and Immunology*, *59*(5), 262–267. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12248>
- Dominguez, J. E., Faccone, D., Tijet, N., Gomez, S., Corso, A., Fernández-miyakawa, M. E., ... Melano, R. G. (2019). *Characterization of Escherichia coli Carrying mcr - 1 -Plasmids Recovered From Food Animals From Argentina*. *9*(March), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00041>
- Dorado, G. (2006). Amplificación de DNA mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). In *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular*. Rabanales.
- Duque, J. (2013). *Acinetobacter baumannii* : Resistencia y Virulencia mediada por el Sistema de Secreción Bacteriano Tipo IV . *Estomologia*, *21*(2), 37–45.
- Edvotek. (2010). Principios y práctica de la electroforesis en gel de agarosa. In *Edvotek*. <https://doi.org//dx.doi.org.ezproxy.fiu.edu/10.1007/s11266-010-9160-6>
- Espinosa, L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. In *Ecología Molecular*. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6584>
- Estévez, M. (2016). *Estudio histórico del uso y prohibición de los promotores del crecimiento en la ganadería española*. Universidad Complutense de Madrid.
- Falomir, M. P., Rico, H., & Gozalbo, D. (2013). Enterobacter and Klebsiella Species Isolated from Fresh Vegetables Marketed in Valencia (Spain) and Their Clinically Relevant Resistances to Chemotherapeutic Agents . *Foodborne Pathogens and Disease*, *10*(12), 1002–1007. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1552>
- FAO, & OMS. (2005). La necesidad de fortalecer los programas nacionales de monitoreo del uso de los antimicrobianos en medicina veterinaria en la región. *Conferencia Regional FAO/OMS Sobre Inocuidad de Los Alimentos Para Las*

Américas y El Caribe, 47. Costa Rica.

- Farfán, A. E., Asiza, S. C., Vargas, F. A., & Vargas, L. V. (2016). Mechanisms of enteropathogenic *Escherichia coli*. *SOCHINF*, 33(4), 13. Retrieved from <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v33n4/art09.pdf>
- Ferreira, C. M., Ferreira, W. A., Almeida, N. C. O. da S., Gomes, F., & Graças, M. (2011). Extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria isolated from hematologic patients in Manaus, state of Amazonas, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(3), 1076–1084. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000300028>
- Fraga, J., Rodríguez, J., Fuentes, O., Castex, M., & Fernández, A. (2004). Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de triatomíneos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar. *REV CUBANA MED*, 56(3), 208–213. Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/mtr/v56n3/mtr10304.pdf>
- García, A., García, E., Hernández, A., Ruiz, J., Yague, G., Herrero, J., & Gómez, J. (2011). Productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. *Quimioter*, 24(2), 57–66. Retrieved from elisag@eresmas.net
- García, M. (2013). *Escherichia coli* portador de betalactamasas de espectro extendido. Resistencia. *Sanid. Mil.*, 69(4), 244–248.
- Gaviria, J., Galeano, N., Restrepo, G., & Hernández, A. (2018). Bacterias diazotróficas con actividad promotora del crecimiento vegetal en *Daucus carota* L. *Ciencia y Agricultura*, 15, 19–27.
- Gema Alexandra López, & Heredia, M. (2013). *Producción y Comercialización de Lechugas y Tomates Hidropónicos en la Ciudad de Guayaquil*. Cat+olica de Santiago de Guayaquil.
- Gene, C. R., Yang, Y., Li, Y., Song, T., Yang, Y., & Jiang, W. (2017). *Colistin Resistance Gene mcr-1 and Its Variant in Escherichia coli Isolates from Chickens in China*. 61(5), 3–7.
- González, F. (2017). *Conocimientos, actitudes y prácticas sobre el uso de antibióticos y la resistencia antimicrobiana en pacientes y médicos de centros de salud de atención primaria de Lima* Tabla de contenidos. Universidad Peruana Cayetano Heredia.
- GREBO. (2010). *Manual de actualización de resistencia bacteriana y normas CLSI M100 – S20 2010*.
- Guanochanga, S. D., & Betancourth, V. M. (2010). *Proyecto de factibilidad para la creación de una empresa dedicada a la producción de lechugas hidropónicas en Quito*. Politecnica Salesiana.
- 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*. 1–8.
- Gutiérrez, J., Luna, L., Mendoza, M., Díaz, G., Burguete, J., & Feliciano, J. (2015).

- Organization, maintenance, and preservation of the Bacterial Culture Collection of the Biological Sciences Institute, University of Science and Arts of Chiapas (UNICACH), Mexico. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 35(2), 95–102.
- Hierro, F. (2014). *Electroforesis de ADN*.
- Hiltunen, T., Virta, M., & Laine, A. L. (2017). The Phenomenon of Antibiotic Resistance in an Evolutionary Perspective. *Philosophical Transactions B*, 1–4. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2016.0039>
- Hoek, A. H. A. M. Van, Veenman, C., Overbeek, W. M. Van, Lynch, G., Maria, A., Husman, D. R., & Blaak, H. (2015). International Journal of Food Microbiology Prevalence and characterization of ESBL- and AmpC-producing Enterobacteriaceae on retail vegetables. *ELSEVIER*, 204, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.014>
- Hunter, P. R., & Gaston, M. A. (1988). typing systems : an application of Simpson ' s Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems : an Application of Simpson ' s Index of Diversity. *Clinical Microbiology*, 26(11), 2465–2467.
- Igem. (2013). *Protocol for TBE-buffer (for gel electrophoresis)*.
- INEC. (2016). Información Ambiental en la Agricultura. In *INEC*. Ecuador.
- iNtRON BIOTECHNOLOGY. (2013). *2x PCR Master mix Solution (i-MAX II)*. (0505), 1–2. Retrieved from <http://www.interchim.fr/ft/D/DO8210.pdf>
- Jiménez, A., Alvarado, A., Gómez, F., Carrero, G., & Fajardo, C. (2014). Factores de riesgo asociados al aislamiento de Escherichia coli o Klebsiella pneumoniae productoras de betalactamasas de espectro extendido en un hospital de cuarto nivel en Colombia. *Biomédica*, 34(1), 16–22. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1650>
- Jimenez, I. (2017). *Biología molecular*.
- Legarraga, P., Wozniak, A., Prado, S., Estrella, L., & García, P. (2018). First report in Chile of a clinical isolate of Escherichia coli resistant to colistin harbouring the mcr-1 gene. *Revista Chilena de Infectología*, 35(4), 453–454. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx327.454>
- Lopardo, H. A. (2016). *MANUAL DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA DE LA ASOCIACIÓN ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA*. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología.
- Luis, J., Narváez, C., & Ortega, J. O. (2014). La supervivencia de los gérmenes intrahospitalarios en superficies inanimadas. *Enfermedades Infecciosas En Pediatría*, XXVII, 394–396.
- Navarro, F., Calvo, J., Cantón, R., & Fernández-cuenca, F. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *ELSEVIER*, 29(7), 524–534. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.011>
- Norizuki, C., Kawamura, K., Wachino, J., Suzuki, M., Nagano, N., Kondo, T., & Arakawa, Y. (2017). Detection of Escherichia coli producing CTX-M-1-group extended-spectrum β -lactamases from pigs in Aichi prefecture, Japan, between

2015 and 2016. *Infectious Diseases Detection*.
<https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2017.206>

- OMS. (2014). Antimicrobial resistance. *World Health Organization*.
- Ortega, D., Barba, P., & Zurita, J. (2016). SHORT REPORT Colistin-resistant *Escherichia coli* clinical isolate harbouring the *mcr-1* gene in Ecuador. *Cambridge University Press*, (March), 1–4. <https://doi.org/10.1017/S0950268816001369>
- Ortega, David, Barba, P., Mena, S., & Espinel, N. (2018). *Escherichia coli* hyperepidemic clone ST410-A harboring *bla* CTX-M-15 isolated from fresh vegetables in a municipal market in Quito-Ecuador. *ELSEVIER*, 280(December 2017), 41–45. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.037>
- Otzen, T., & Manterola, C. (2017). Técnicas de Muestreo sobre una Población a Estudio Sampling Techniques on a Population Study. *Int. J. Morphol*, 35(1), 227–232. Retrieved from <http://www.scielo.cl/pdf/ijmorphol/v35n1/art37.pdf>
- Paciel, D., Rieppi, G., Buroni, M., & Medina, J. (2011). cy Guías para el tratamiento de bacterias productoras de KPC Uso de antimicrobianos en infecciones por microorganismos multi y panresistentes y Guías para el tratamiento de ba. In *SICU*.
- Park, H., Kim, J., Ryu, S., & Jeon, B. (2019). Journal of Global Antimicrobial Resistance Predominance of *bla* CTX-M-65 and *bla* CTX-M-55 in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from raw retail chicken in South Korea. *ELSEVIER*, 17, 216–220. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.01.005>
- Pedersen, M. G., Olesen, H. V., Jensen-fangel, S., Nørskov-lauritsen, N., & Wang, M. (2017). Colistin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Achromobacter* spp . cultured from Danish cystic fi brosis patients is not related to plasmid-mediated expression of *mcr-1*. *Journal of Cystic Fibrosis*, 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2017.12.001>
- Pelayo, M. (2019). La seguridad alimentaria en las ferias y mercados al aire libre Las elevadas temperaturas pueden aumentar el factor de riesgo sanitario en mercados y ferias de alimentos Mayte Pelayo. *Eroski Consumer*.
- Peña, I. (2016). *Enterobacterias productoras de carbapenemasas: tipos, epidemiología molecular y alternativas terapéuticas*. 194. Retrieved from <http://eprints.ucm.es/38513/1/T37533.pdf>
- Peña, Y., Espino, M., & Castillo, V. (2011). Resistencia antimicrobiana en *Salmonella* y *E. coli* aisladas de alimentos: revisión de la literatura. *Panorama Cuba y Salud*, 6(1), 157–160. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=477348946047>
- PÉREZ, E. A. (2015). *Cuantificación de Escherichia coli productor de β -Lactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en los puntos críticos de control en camalesindustriales de la provincia de Pichincha*. Central del Ecuador.
- Perianes, M. E., Novo, I., Solís, K., Prolo, A., García, I., & Alonso, G. (2014). Bacteriemia por *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido: factores asociados a mortalidad y reingreso hospitalario. *Medicina Clinica*, 142(9), 381–386.

<https://doi.org/10.1016/j.medcli.2013.01.048>

- Resurrección, C., Montenegro, J. J., Chiappe, A., Vargas, R., Cucho, C., Mamani, D. H., & Huaroto, L. M. (2017). Klebsiella pneumoniae nueva Delhi metalo-betalactamasa en el Hospital Nacional Dos de Mayo. Lima, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 34(2), 261–267. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2017.342.2615>
- Rivera, M., Ulloa, C. R., Clavo, R. F., López, L. S., & Gil, Z. A. (2015). Betalactamasas De Espectro Extendido Tipo Tem. *Rev Peru Med Exp Salud Publica BETALACTAMASAS*, 32(4), 752–755.
- Robledo, I. E., Aquino, E. E., Santana, J. L., Otero, D. M., Leo, C. F., & Va, G. J. (2010). *Detection of KPC in Acinetobacter spp . in Puerto Rico* □. 54(3), 1354–1357. <https://doi.org/10.1128/AAC.00899-09>
- Ruimy, R., Brisabois, A., Bernede, C., Skurnik, D., Barnat, S., Arlet, G., ... Andremont, A. (2010). Organic and conventional fruits and vegetables contain equivalent counts of Gram-negative bacteria expressing resistance to antibacterial agents. *Environmental Microbiology*, 12, 608–615. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02100.x>
- Salto, P. (2017). *Caracterización de plásmidos de Acinetobacter spp. de origen hospitalario y ambiental*. UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA.
- Smith, C. S. C. (2015). *Gel Electrophoresis*.
- Sobral, D., Cann, P. Le, Gerard, A., Jarraud, S., Lebeau, B., Vergnaud, G., & Pourcel, C. (2011). *High-Throughput Typing Method To Identify a Non-Outbreak-Involved Legionella pneumophila Strain Colonizing the Entire Water Supply System in the Town of Rennes , France* □ †. 77(19), 6899–6907. <https://doi.org/10.1128/AEM.05556-11>
- Stock, I., Gröger, T., & Wiedemann, B. (2016). *Natural Antibiotic Susceptibility of Rahnella aquatilis and R . aquatilis-Related Strains Natural Antibiotic Susceptibility of Rahnella aquatilis and R . aquatilis -Related Strains*. 9478(April). <https://doi.org/10.1179/joc.2000.12.1.30>
- Tafur, D., Villegas, V., & Torres, J. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *CIDEIM*, 3, 223–233.
- Torres, T., & Martinez, R. (2013). *GUÍA PARA MUESTREO DE ALIMENTOS*.
- Wass, T. J., Farhana, S., Rahman, S., Carvalhais, L., Ferguson, B., & Schenka, P. (2019). Complete Genome Sequence of Achromobacter spanius UQ283, a Soilborne Isolate Exhibiting Plant Growth- Promoting Properties. *American Society for Microbiology*, (April), 18–19.
- Yao, X., Doi, Y., Zeng, L., Lv, L., & Liu, J.-H. (2016). Carbapenem-resistant and colistin-resistant Escherichia coli co-producing NDM-9 and MCR-1. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(3), 288–289. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00057-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00057-8)
- Zhao, W., & Hu, Z. (2012). Acinetobacter : A potential reservoir and dispenser for β -lactamases. *Healthcare*, 38(July 2011), 30–51.

<https://doi.org/10.3109/1040841X.2011.621064>

Zhao, W., & Hu, Z. (2013). Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Healthcare*, 39(March 2012), 79–101.

<https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.691460>

Zuleima, E., Vegasa, S. De, & Nieves, B. (2005). *Acinetobacter spp. : Aspectos microbiológicos , clínicos y epidemiológicos.*