

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
AMBIENTALES
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA



**IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE *Escherichia coli* RESISTENTES A
CEFALOSPORINAS DE TERCERA GENERACIÓN EN EL CANAL DE RIEGO
CANANVALLE-IBARRA.**

TRABAJO DE GRADO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO/A EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORAS:

ARMAS RUIZ, DAYANNA LIZBETH
VIZCAINO CHURO, GISSELA ESTEFANIA

DIRECTOR:

BLGO. BARBA ESTRELLA PEDRO MIGUEL MSc.

Ibarra – Ecuador
2023



FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR

Por medio del presente yo MSc. Pedro Barba, certifico que la Srta. Dayanna Lizbeth Armas Ruiz con cédula de ciudadanía Nro. 1004163554 y la Srta. Gissela Estefanía Vizcaino Churo con cédula de ciudadanía Nro. 1004345060. Han trabajado en el desarrollo del proyecto de tesis "Identificación de cepas de *Escherichia coli* resistentes a cefalosporinas de tercera generación en el canal de riego Cananvalle-Ibarra", previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología, lo cual lo han realizado en su totalidad con responsabilidad y esmero.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad.

En la ciudad de Ibarra, a los 7 días del mes de diciembre del 2023.

Atentamente

MSc. Pedro Barba

DIRECTOR TRABAJO DE GRADO

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:	1004163554		
APELLIDOS Y NOMBRES:	ARMAS RUIZ DAYANNA LIZBETH		
DIRECCIÓN:	OTAVALO - CDLA JACINTO COLLAHUAZO I ETAPA (FRANCISCO ANGUAYO Y ESTEBAN PERALTA)		
EMAIL:	dlarmasr@utn.edu.ec		
TELÉFONO FIJO:	062921891	TELÉFONO MÓVIL:	0990366811

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	1004345060		
APELLIDOS Y NOMBRES:	VIZCAINO CHURO, GISSELA ESTEFANIA		
DIRECCIÓN:	EJIDO DE IBARRA, CALLE 5 DE DICIEMBRE 1-68 Y AVENIDA MARIANO ACOSTA		
EMAIL:	gevizcainoc@utn.edu.ec		
TELÉFONO FIJO:	062631438	TELÉFONO MÓVIL:	0980599671

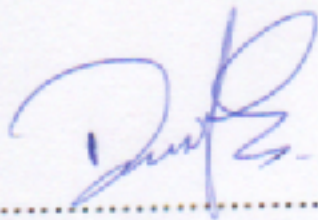
DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	Identificación de cepas de <i>Escherichia coli</i> resistentes a Cefalosporinas de tercera generación en el canal de riego Cananvalle-Ibarra.
AUTOR (ES):	Armas Dayanna Vizcaíno Gissela
FECHA: DD/MM/AAAA	13/12/2023
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO <input type="checkbox"/> POSGRADO
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniera en Biotecnología
ASESOR /DIRECTOR:	Blgo. Pedro Barba Msc.

2. CONSTANCIAS

Las autoras manifiestan 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 son de las titulares de los derechos patrimoniales, por lo que asumen la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrán en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

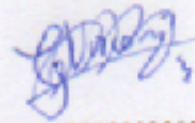
Ibarra, a los 13 días del mes de diciembre del 2023

EL AUTOR:



.....
Dayanna Lizbeth Armas Ruiz

C.I.: 1004163554



.....
Gissela Estefanía Vizcaíno Churo

C.I.: 1004345060

AGRADECIMIENTO

Al finalizar este trabajo, queremos extender un eterno agradecimiento a Dios y a cada uno de nuestro familiares por estar siempre presentes, apoyándonos y guiándonos incondicionalmente durante esta etapa universitaria.

De manera especial, a nuestro director, MSc. Pedro Barba, por confiar en nosotras desde que empezó el proyecto de investigación, orientándonos con su sabiduría y experiencia en cada objetivo propuesto. Nuestra más sincera gratitud por su dedicación, paciencia y apoyo durante todo este tiempo

A nuestros asesores, MSc Nubia Grijalva, Dra. María Cristina Echeverría PhD y MSc. Gabriel Chimbo, por su ayuda con la redacción y sugerencias en la realización de este trabajo investigativo. A los profesores quienes nos han inculcado sus conocimientos y han contribuido a nuestra formación profesional.

A los laboratorios de Biotecnología Vegetal y Aplicada de la Universidad Técnica del Norte, por facilitarnos el espacio y equipos necesarios para el desarrollo de esta investigación.

Finalmente, a nuestros compañeros que, de manera desinteresada, nos han ayudado y nos han brindado la motivación suficiente para culminar con éxito la meta propuesta.

Dayanna Armas

Gissela Vizcaíno

DEDICATORIA

Esta investigación esta dedicada a Dios quien me guía a lo largo de mi vida y me permite culminar mi carrera universitaria. Especialmente dedico este trabajo a mi mamá Nuria Ruiz, la persona más importante de mi vida quien a través de su ejemplo, esfuerzo, dedicación y amor, me ha ayudado a cumplir este sueño profesional que tanto anhelábamos. Por acompañarme y darme la fortaleza de seguir adelante a pesar de las adversidades que se presenten, impulsándome siempre a ser mejor cada día.

A mis abuelitos Tarquino Ruiz (+) y Guadalupe Jácome por ser los pilares fundamentales desde mi infancia. A mi abuelita por brindarme su apoyo incondicional y motivarme todos los días a ser una mujer con buenos valores y virtudes, creyéndome capaz de lograr cada objetivo que me proponga

A mi familia en general, quienes han estado en cada uno de mis logros personales, académicos y nunca me han dejado sola durante este proceso. A mis amigos y amigas que conocí durante los años de mi vida universitaria, por su amistad sincera, compañía (dentro y fuera de las clases) y apoyo en los momentos más difíciles

Finalmente, a mi compañera de tesis y futura colega por ser un soporte primordial cada día, desde que asumimos este gran reto. Por esforzarnos y alentarnos mutuamente como un verdadero equipo, pero, sobre todo, por compartir muchas experiencias y anécdotas que siempre las llevaré en mi corazón.

Dayanna Armas

DEDICATORIA

El trabajo se lo dedico a Dios quien supo guiarme por el buen camino y darme las fuerzas para seguir adelante. Principalmente con mucho cariño se lo dedico a mis padres Manuel Vizcaíno y Liliana Churo que sin dudarlos se sacrifican día a día por darme un buen futuro y por ayudarme a cumplir una meta más en vida. Mis padres me han dado todo lo que soy como persona, mis valores y principios para conseguir todos mis objetivos. A mi hermano Christopher por ser la razón de mi vida para esforzarme y ser mejor por y para él.

A mis abuelitos Jorge Vizcaíno y Delia Fonte, quienes son lo más valioso que tengo en la vida, por ser el pilar de mi familia y ser un apoyo incondicional; por su motivación diaria y creer en mí en cada paso, impulsándome a ser mejor a nivel personal y profesional.

A mis demás familiares, en especial a mis tías por compartir momentos importantes a mi lado y siempre estar dispuestas a escucharme ante cualquier circunstancia. A mis amigas y amigos por su amistad sincera durante todos estos años y por participar en cada instante.

En forma especial a mi compañera de tesis y amiga Dayanna por su apoyo y fuerza para seguir adelante en cada paso del trabajo investigativo. Por las vivencias y experiencias a lo largo de este tiempo, como un gran equipo para lograr esta meta. Deseándole lo mejor.

Gissela Vizcaíno

RESUMEN

En los últimos años, las bacterias han desarrollado mecanismos que les permiten resistir el ataque de los antibióticos, además de que se propaguen a través de la cadena alimenticia o por contacto directo con el ambiente (agua, suelo). La presente investigación buscó aislar y caracterizar cepas de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido en el canal de riego Cananvalle-Ibarra. Se recolectaron muestras de agua, suelo y vegetales (cilantro, lechuga) en diferentes puntos del canal. Mediante filtración, se aislaron cepas de *E. coli*, confirmando la especie mediante pruebas bioquímicas y moleculares. Se determinó el perfil de susceptibilidad de acuerdo con la guía CLSI (2023) y se usó la técnica de sinergia de doble disco para la identificación fenotípica de la producción de betalactamasas de espectro extendido. Finalmente, se empleó PCR y secuenciación Sanger para la detección de tres genes de resistencia a antibióticos. Se obtuvo un total de 174 cepas de *E. coli*, el 78.2% perteneció a muestras de agua, el 11.5% a vegetales y el 10.3% a suelo. Todas las cepas fueron resistentes al antibiótico cefotaxima y un 97.8% a ceftazidima. Mientras que todos los aislados fueron sensibles a ertapenem, amikacina y tigeciclina; además mediante la prueba fenotípica se determinó que el 100% de los aislados presentaron producción de BLEE. El análisis molecular encontró la presencia de los genes *bla*_{CTX-M55} (70.6%) y *bla*_{CTX-M65} (11.1%), sin embargo, ningún aislado expresó los genes *bla*_{KPC} y *bla*_{NDM}. En base a esta información se determinó al canal de riego Cananvalle como una posible fuente de diseminación de bacterias resistentes, que puede influir en su transmisión a personas a través de la cadena alimenticia.

Palabras clave: Resistencia bacteriana, diseminación, BLEE, canal de riego, secuenciación, *bla*_{CTX}.

ABSTRACT

In recent years, bacteria have developed mechanisms that allow them to resist the effect of antibiotic and proliferate through the food chain or the environment (water, soil). The present research looks for the isolation and characterization of strains of *Escherichia coli* that produce extended-spectrum β -lactamases in the Cananvalle-Ibarra irrigation canal. Water, soil, and vegetable samples (coriander, and lettuce) were collected at different points of the canal. The strains of *E. coli* were isolated by filtration. The confirmation of the species was performed by biochemical and molecular tests. The susceptibility profile was determined according to the CLSI guideline (2023), and the double-disc synergy technique was used for the phenotypic identification of extended-spectrum beta-lactamase production. Finally, PCR and Sanger sequencing were used to detect three antibiotic resistance genes. A total of 174 strains of *E. coli* were obtained, 78.2% belonged to water samples, 11.5% to vegetables and 10.3% to soil. All strains were resistant to the antibiotic cefotaxime and 97.8% to ceftazidime. While all isolates were sensitive to ertapenem, amikacin and tigecycline; In addition, through the phenotypic test, it was determined that 100% of the isolates presented ESBL production. Molecular analysis found the presence of the genes *bla*_{CTX-M55} (70.6%) and *bla*_{CTX-M65} (11.1%), however, no isolates expressed the *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} genes. Based on this information, the potential of the Cananvalle irrigation canal as a possible source of dissemination of resistant bacteria which may influence their transmission to people through the food chain.

Keywords: Bacterial resistance, dissemination, ESBL, irrigation canal, sequencing, *bla*_{CTX}.

LISTA DE SIGLAS

- ADN:** Ácido desoxirribonucleico que contiene la información hereditaria.
- AK:** Amikacina. Macrólidos para el tratamiento de infecciones bacterianas
- AMC:** Amoxicilina/ácido clavulánico.
- AmpC:** Serin-betalactamasas en diversas enterobacterias y en bacilos Gram negativos
- AZM:** Azitromicina. Antibiótico de amplio espectro
- BLEE:** Betalactamasas de espectro extendido
- CAZ:** Ceftazidima. Cefalosporina de amplio espectro, de tercera generación.
- CIM:** Concentración mínima inhibitoria
- CIP:** Ciprofloxacina que pertenece a una clase de antibióticos llamados fluoroquinolonas.
- CLSI:** Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio
- CN:** Gentamicina. Aminoglucósido de amplio espectro y acción bactericida
- CTX:** Cefotaxima. Cefalosporina de amplio espectro de tercera generación
- CTX-M:** Grupo de enzimas betalactamasas con propiedades de espectro extendido
- ETP:** Ertapenem. Del grupo de los betalactámicos carbapenémicos.
- F:** Nitrofurantoina perteneciente al grupo de los nitrofuranos
- FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
- FEP:** Cefepime perteneciente a las cefalosporinas de cuarta generación
- FF:** Fosfomicina utilizado en las infecciones urinarias con efectos bactericidas
- FOX:** Cefotixitina. Cefalosporina de segunda generación
- KPC:** Principal carbapenemasa en enterobacterias.
- LEV:** Levofloxacina con actividad frente a bacterias Gram negativas

MEGA: Análisis genético evolutivo molecular. Software informático

NDM: Carbapenemasa del tipo Nueva Delhi metalobetalactamasa

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RAM: Resistencia Antimicrobiana

SHV: Grupo de enzimas betalactamasas con múltiples variantes

SIM: Medio de cultivo “Sulfhídrico indol movilidad”

SXT: Trimetoprima sulfametoxazol

TBX: Medio de cultivo selectivo y diferencial “Tryptona bilis X-glucorónido”

TE: Tetraciclina que abarcan un amplio espectro en su actividad antimicrobiana

TEM: Grupo de enzimas que se derivan de las betalactamasas de espectro reducido

TGC: Tigeciclina Antibiótico bacteriostático del grupo de las gliciliclinas

TPX: Piperacilina/tazobactam. Antibiótico bactericida

TSB: Caldo de soja y tripticaseína de uso general en el laboratorio de microbiología

TSI: Medio de cultivo “Agar Triple Azúcar Hierro”

UFC: Unidades formadoras de colonias

Índice de contenidos

CAPÍTULO I	19
INTRODUCCIÓN.....	19
1.1 Problema de investigación.....	19
1.2 Justificación.....	20
1.3 Pregunta directriz de la investigación.....	21
1.4 Objetivos.....	21
1.4.1. Objetivo general.....	21
1.4.2. Objetivos específicos.....	21
CAPÍTULO II	23
MARCO TEÓRICO.....	23
2.1 Antibióticos.....	23
2.1.1 Antibióticos betalactámicos.....	23
2.1.1.1 Cefalosporinas.....	24
2.1.1.2 Cefalosporinas de Primera y Segunda generación.....	25
2.1.1.3 Cefalosporinas de Tercera Generación.....	25
2.1.1.4 Cefalosporinas de Cuarta Generación.....	25
2.1.2 Carbapenémicos.....	26
2.2 Resistencia Antimicrobiana.....	26
2.3 Mecanismos de Resistencia.....	28

2.3.1	Genes de Resistencia en bacterias.....	29
2.3.2	Betalactamasas de espectro extendido (BLEE).....	30
2.3.3	Betalactamasas de tipo AmpC.....	31
2.3.3.1	BLEE CTX-M.....	31
2.3.3.2	BLEE KPC.....	32
2.3.3.3	BLEE NDM.....	33
2.4	<i>Escherichia coli</i>	33
2.5	Fuentes de Diseminación de resistencia a antibióticos.....	34
2.5.1	Agua.....	34
2.5.2	Canal de Riego.....	35
2.5.3	Vegetales.....	35
2.5.4	Suelo.....	35
2.5.5	Fuentes Hospitalarias.....	36
2.6	Problemática/Actualidad.....	36
2.7	Detección y análisis genes de resistencia mediante PCR y secuenciación Sanger. ..	36
2.7.1	Amplificación de ADN por PCR.....	36
2.7.2	Secuenciación Sanger.....	37
	CAPÍTULO III	38
	METODOLOGÍA	38
3.1.	Descripción del área de estudio.....	38

3.2 Material biológico.....	39
3.2.1 Recolección de muestras de agua, vegetales y suelo.	39
3.2.2 Preparación de medios de cultivo.	39
3.2.3 Procesamiento de las muestras vegetales y de suelo.	39
3.2.4 Suspensión y filtración de muestras.....	40
3.2.5 Aislamiento de <i>Escherichia coli</i> resistentes a cefalosporinas de tercera generación.	40
3.2.6 Conservación de <i>Escherichia coli</i> BLEE.....	41
3.3 Identificación fenotípica y molecular de <i>E. coli</i>	41
3.3.1. Tinción Gram.....	41
3.3.2 Identificación de <i>Escherichia coli</i> mediante pruebas bioquímicas.....	41
3.2.9 Identificación de <i>Escherichia coli</i> mediante pruebas moleculares.....	42
3.3. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana.	45
3.3.1 Preparación del medio de cultivo.....	45
3.3.2 Preparación del inóculo.....	45
3.3.3 Antibiogramas.....	45
3.3.4 Prueba de sinergia de doble disco para la detección de la producción de BLEE. ...	46
3.3.5 Determinación del perfil de susceptibilidad en base a la guía del CLSI.	46
3.4. Identificación de genes de resistencia (BLEE) a antibióticos.	47
3.4.1 Amplificación de los genes de resistencia mediante PCR.	48

3.4.2 Electroforesis.	49
3.4.3 Secuenciación y análisis de secuencias para determinar las variantes de los genes de resistencia.....	49
3.5 Análisis estadístico.	49
CAPÍTULO IV	51
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
4.1 Determinación de recuentos bacterianos.	51
4.2.1 Pruebas bioquímicas para la identificación de <i>E. coli</i>	57
4.2.2 Prueba molecular para la identificación de <i>E. coli</i>	58
4.3 Identificación de perfiles de susceptibilidad en los aislados obtenidos.....	59
4.3.1 Perfiles de susceptibilidad en muestras de agua.....	59
4.3.2 Perfiles de susceptibilidad en aislados de <i>E. coli</i> en muestras vegetales.	63
4.3.3 Perfiles de susceptibilidad en muestras de suelo.....	67
4.4 Multirresistencia en los aislados.....	71
4.5 Identificación fenotípica de betalactamasas de espectro extendido BLEE.	73
4.6 Detección molecular de la presencia de genes de resistencia.....	75
CAPÍTULO V	81
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	81
5.1 Conclusiones	81
5.2 Recomendaciones	82

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
ANEXOS	107

Índice de Figuras

Figura 1. Resistencia bacteriana	28
Figura 2. Mapa de localización de Cananvalle-Ibarra.....	32
Figura 3. Filtración de muestras y aislamiento.....	40
Figura 4. Extracción de ADN bacteriano por ebullición.....	43
Figura 5. Electroforesis	44
Figura 6. Elaboración de antibiogramas con 17 tipos de antibióticos.....	46
Figura 7. Recuento de UFC/ml en muestras de agua	51
Figura 8. Recuento de UFC/ml del canal de riego.....	53
Figura 9. Recuento de UFC/ml en dos tipos de vegetales.....	55
Figura 10. Recuento de UFC/ml en dos puntos del canal de riego	56
Figura 11. Amplificación del gen uidA de la especie bacteriana <i>E. coli</i>	59
Figura 12. Perfil de resistencia en muestra de agua	60
Figura 13. Perfil resistencia en muestra de agua por familias de antibióticos.....	62
Figura 14. Perfil de resistencia en muestras vegetales	65
Figura 15. Perfil de resistencia en muestras vegetales por familias de antibióticos.....	67
Figura 16. Perfil de resistencia en muestras de suelo	67

Figura 17. Perfil de resistencia en muestra de suelo por familias de antibióticos.	70
Figura 18. Perfil de susceptibilidad general.	71
Figura 19. Técnica de difusión en agar	74
Figura 20. Amplificación del grupo bla _{CTX-M1} de la especie bacteriana <i>E. coli</i>	75

Índice de tablas

Tabla 1 Parámetros para identificación <i>E. coli</i> en pruebas bioquímicas.	42
Tabla 2 Programación de PCR para confirmación de especie.....	44
Tabla 3 Criterio de interpretación de la zona de inhibición según CLSI 2023.....	46
Tabla 4 Secuencia de cebadores para la identificación de genes BLEE.....	48
Tabla 5 Identificación bioquímica de <i>E. coli</i>	58
Tabla 6 Perfil de susceptibilidad en muestras de agua para 17 antibióticos.....	61
Tabla 7 Perfil de susceptibilidad en muestras vegetales ante 17 antibióticos.	66
Tabla 8 Perfil de susceptibilidad en muestras de suelo ante 17 antibióticos.	69
Tabla 9 Aislados multirresistentes.....	72
Tabla 10 Variantes de genes de resistencia encontrados en este estudio.....	77
Tabla 11 Variantes de genes de resistencia encontrados en muestras de agua, vegetales y suelo.....	78

Índice de anexos

Anexo 1. Mapa de ubicación de los puntos de muestreo en el canal de riego Cananvalle.	107
Anexo 2. Aislamiento de <i>E. coli</i>	108
Anexo 3. Identificación mediante tinción Gram.	108
Anexo 4. Antibiogramas obtenidos de las cepas de <i>E. coli</i> en muestras de agua.	109
Anexo 5. Antibiogramas obtenidos de las cepas de <i>E. coli</i> en muestras vegetales.....	109
Anexo 6. Antibiogramas obtenidos de las cepas de <i>E. coli</i> en muestras de suelo	109
Anexo 7. Perfil de sensibilidad de cada aislado de muestra de agua ante 17 antibióticos..	110
Anexo 8. Perfil de sensibilidad de cada aislado de muestra vegetal ante 17 antibióticos..	114
Anexo 9. Perfil de sensibilidad de cada aislado de muestra de suelo ante 17 antibióticos	115
Anexo 10. Análisis de secuencias.	116
Anexo 11. Variantes de genes de resistencia encontrados en el estudio.	116

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Problema de investigación

En los últimos años la resistencia bacteriana se ha convertido en un problema de salud pública, siendo la razón principal de este fenómeno el uso indiscriminado de fármacos, tanto en la clínica como en la salud animal, y la liberación de contaminantes en el medio ambiente (Jiménez et al., 2022). En consecuencia, las infecciones causadas por bacterias multirresistentes siguen en aumento, generando una elevada morbilidad y mortalidad en diferentes continentes (ECODES, 2022). De acuerdo con la OMS (2020), los carbapenémicos y las cefalosporinas de tercera generación ya no generan los efectos terapéuticos esperados.

Actualmente, la incidencia de cepas de *Escherichia coli* resistentes a antibióticos betalactámicos se ha incrementado, especialmente para cefalosporinas de tercera y cuarta generación, en un 82 y 84%, respectivamente (Carvajal et al., 2019). Estas bacterias producen las enzimas Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) que inactivan el anillo betalactámico de este tipo de antibióticos, ocasionando persistencia en infecciones graves o incluso mortales (Morejón, 2013). Por tal razón, se busca reforzar las estrategias de una terapéutica antimicrobiana adecuada y disminuir sus fuentes de diseminación de bacterias resistentes.

Los organismos sintetizadores de BLEE se diseminan de diversas maneras: los hospitales son considerados como reservorios comunes para bacterias multirresistentes, esparciéndose mediante termómetros, cánulas de oxígeno, gel de ecografías, por contacto del personal de salud o pacientes infectados, entre otros (García, 2013). Sin embargo, en la comunidad existen otras formas en que estas bacterias pueden propagarse: a través de heces contaminadas, animales, alimentos de origen animal o vegetal y reservorios ambientales altamente contaminados con residuos antimicrobianos (ECDC, 2015).

Las cisternas ambientales (pozos, sistemas de alcantarillado, cuencas fluviales, canales de riego), son vectores de infección que pueden provocar infecciones adquiridas dentro de la comunidad y crear las condiciones favorables para que estos microorganismos sigan

desarrollándose (Vital et al., 2018). Las bacterias que se encuentran hoy en el agua o el suelo tienen una variedad de genes de resistencia, debido a la actividad humana. (UNEP, 2017)

Por ejemplo, las aguas superficiales contaminadas se utilizan cada vez más para el riego de diferentes entornos agrícolas por su fácil disponibilidad para los agricultores, además por el limitado suministro de agua en el sector urbano (Guadarrama y Galván, 2015). Algunos estudios han demostrado que los canales de riego son fuentes de diseminación en la aparición de bacterias resistentes a antibióticos, demostrando la presencia de estos microorganismos hasta en un 67.3%, en comparación con aislados resistentes en vegetales (61.5%) y aislados resistentes en suelo (56.4%) (Flores, 2019).

A nivel local, Pinto (2020) identificó la presencia de microorganismos con potencial patógeno en cilantro, lechuga y perejil tales como: *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea* y *Serratia*, expendidos en los mercados de la ciudad de Ibarra. Otra investigación realizada por Plasencia (2020), concuerda que en la ciudad de Ibarra sí se comercializan vegetales con presencia de cepas de *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido, siendo un factor de riesgo para la diseminación de infecciones con bacterias resistentes en la población.

Con el tiempo, el consumo de productos vegetales contaminadas con bacterias resistentes originadas en canales de riego podría aumentar el riesgo de causar más infecciones de difícil tratamiento en seres humanos facilitando la propagación de estos microorganismos. (Vital et al., 2018). Se ha identificado en muestras de agua de canales de riego genes de resistencia a cefalosporinas de tercera generación como *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M}, siendo responsables de los altos niveles de resistencia reportados en varios estudios (Zhang et al., 2019).

1.2 Justificación

Debido a la alta prevalencia de microorganismos productores de BLEE, se ha evidenciado la necesidad de vigilar su ocurrencia en hospitales, así como en la comunidad, la producción animal y el ambiente aportando al control de este tipo de infecciones (Velandia et al., 2016). Asimismo, profundizar sobre las características moleculares relacionadas con mecanismos de resistencia y su capacidad de transmisión (Marrero et al., 2017). Sin embargo, la alta propagación de *E. coli* BLEE ha incentivado a que varios investigadores consideren la caracterización en otras fuentes de diseminación, como son los canales de riego, puesto que

su uso en la agricultura y posterior consumo de productos agrícolas podrían tener consecuencias difíciles de manejar (Andrade et al., 2020).

A nivel de Imbabura, no se ha realizado estudios en canales de riego; sin embargo, Plasencia, (2020) encontró que en la ciudad de Ibarra se comercializan vegetales con presencia de cepas de *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido. Por lo tanto, es importante identificar la fuente o procedencia de este tipo de contaminación y evaluar diversos enfoques en torno al acceso y control del agua de riego para la producción local de alimentos. En muchos de los casos se desconoce la calidad del agua y el cumplimiento de las buenas prácticas agrícolas en el uso y manejo de este recurso (Guerra, 2020).

Finalmente, esta investigación permitiría generar más información sobre los cambios en el patrón de resistencia antimicrobiana a lo largo del canal de riego, que permitan evidenciar la influencia de la actividad antropogénica sobre el canal. Esto establecerá una línea de base para futuras investigaciones con el fin de generar estrategias de prevención y control a nivel local, además de orientar en la toma de decisiones en políticas públicas (Nocua et al., 2017). Por otra parte, crear conciencia sobre el empleo de los antibióticos y la liberación de contaminantes al medio ambiente (Zhang et al., 2019).

1.3 Pregunta directriz de la investigación

¿El canal de riego Cananvalle de la ciudad de Ibarra presenta *Escherichia coli* productoras de β -lactamasa de espectro extendido?

1.4 Objetivos

1.4.1. Objetivo general.

Caracterizar cepas de *Escherichia coli* resistente a cefalosporinas de tercera generación en el canal de riego Cananvalle- Ibarra.

1.4.2. Objetivos específicos.

- Aislar *Escherichia coli* resistentes a cefalosporinas de tercera generación presentes en muestras vegetales y en el canal de riego Cananvalle en la ciudad de Ibarra.

- Determinar los perfiles de susceptibilidad antimicrobianos mediante antibiogramas en las cepas aisladas de *Escherichia coli*.
- Identificar la presencia de genes BLEE en aislados de *Escherichia coli* mediante PCR.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antibióticos

Los antibióticos también conocidos como antimicrobianos, son un amplio grupo de fármacos que se utilizan para tratar enfermedades infecciosas causadas por bacterias, ya sea erradicándolas o inhibiendo su crecimiento (Carter, 2021). Pueden derivar de microorganismos (bacterias u hongos) o de sustancias parcialmente sintéticas, que fueron modificados en el laboratorio (Paredes y Roca, 2004). En este sentido, pueden agruparse en clases o familias en función a sus propiedades, estructura química, y el tipo de bacterias que combaten (Alvo et al., 2016).

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1928, se fueron agregando nuevas familias de antibióticos incluidas las tetraciclinas, aminoglucósidos y macrólidos (Arco, 2014). Hoy en día, estos antibióticos combaten diversas infecciones bacterianas en humanos y animales (Carter, 2021), facilitando muchos procedimientos médicos, incluido el tratamiento del cáncer (Hutchings et al., 2019).

Sin embargo, según numerosos estudios más del 50% de las prescripciones de antibióticos, se realizan en forma empírica (González et al., 2019). Un estudio indicó la tasa de administración de antibióticos de amplio espectro alrededor del 72% en pacientes con SARS- CoV-2, aún en ausencia de sobreinfección bacteriana (Rizvi & Ahammad, 2022).

2.1.1 *Antibióticos betalactámicos.*

Los antibióticos betalactámicos son una amplia clase de antimicrobianos que incluyen penicilinas, monobactámicos, cefalosporinas y carbapenémicos, los cuales poseen un anillo betalactámico en su estructura. Entre las ventajas terapéuticas que aportan se encuentran: accesibilidad, seguridad y un mecanismo de acción único, siendo el 50% de los fármacos más recetados a nivel mundial (Astocondor, 2018).

Su mecanismo de acción al ser agentes bactericidas, actúan principalmente a través de dos mecanismos: inhibición de la síntesis de la pared bacteriana e inducción de la autólisis que

destruye el peptidoglicano (Suárez y Gudiol, 2009). De la misma manera, algunos autores los categorizan como bactericidas parciales porque solo actúan en fase de crecimiento celular.

Sin embargo, con el aumento del consumo y uso indebido de estos fármacos para tratar infecciones menores, la resistencia antimicrobiana ha escalado tasas incontrolables. En este caso, las bacterias Gram negativas son las principales protagonistas en el aumento de la resistencia, ya sea por genes transportados en plásmidos u otros elementos genéticos móviles que confieren resistencia a los betalactámicos. El mecanismo de resistencia más conocido es la producción de enzimas betalactamasas debido a su perfil de sustrato y sus implicaciones epidemiológicas (N. Reddy et al., 2020).

2.1.1.1 Cefalosporinas

Las cefalosporinas son bactericidas que actúan de manera similar a las penicilinas. Se unen a proteínas transportadoras e impiden la síntesis de la pared celular bacteriana, responsable de la producción del peptidoglicano. Sin embargo, la resistencia a las cefalosporinas puede ser consecuencia de la mala permeabilidad del fármaco dentro de las bacterias, la falta de proteínas transportadoras o la degradación por betalactamasas.

Las cefalosporinas se dividen en cinco grandes grupos o “generaciones” según su actividad antibacteriana: las cefalosporinas de primera generación con buena actividad contra microorganismos aerobios Gram positivos y en menor cantidad Gram negativos adquiridos en la comunidad como (*P. mirabilis*, *E. coli*, *Klebsiella*). Los fármacos de segunda generación poseen un espectro ligeramente extendido contra bacterias aeróbicas Gram negativas y las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, por su amplio espectro tienen actividad contra muchas bacterias aeróbicas (Gruenberg, 2021). La única cefalosporina de quinta generación disponible es la ceftarolina, debido a su amplio espectro contra microorganismos Gram positivos multirresistentes, incluyendo *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y vancomicina (AEP, 2020)

2.1.1.2 Cefalosporinas de Primera y Segunda generación.

Estos fármacos constituyen un grupo heterogéneo con diferencias individuales significativas en actividad y farmacocinética. Las cefalosporinas de primera generación incluyen fármacos como la cefalexina, cefadroxil, cefapirina, cefalotina, cefazolina, cefradina, cefapirina; que son resistentes a las betalactamasas del *Staphylococcus* y otros cocos Gram positivos. Cabe señalar que en los fármacos de segunda generación (cefexitina, cefuroxima, cefprozilo, efactor, cefamandol, cefonicid, ceforinida, cefuroxime, cefotetan y el cefmetazole) son menos activos contra microorganismos Gram positivos y con mayor actividad en enterobacterias para el tratamiento de las infecciones (Gonz et al., 2012)

2.1.1.3 Cefalosporinas de Tercera Generación

Las cefalosporinas de tercera generación son medicamentos utilizados en el manejo y tratamiento de organismos Gram negativos y Gram positivos (Arumugham, 2022). La terapia antimicrobiana que incluyen antibióticos como la cefotaxima, ceftriaxona, cefoperazona, cefixima, cefdinir, cefpodoxima proxetil, ceftibuteno, moxalactam, cefmenoxima y ceftazidima, es una de las primeras elecciones para tratar infecciones en los últimos tiempos (Díaz et al., 2014).

Varios autores han recomendado a este grupo de cefalosporinas porque demuestran mayor estabilidad a las betalactamasas, especialmente las producidas por *Kleibsell*, *Haemophylus influenzae* y *E. coli*. Sin embargo, farmacocinéticamente algunos compuestos de tercera generación se absorben mal en el tracto gastrointestinal y se administran solo por vía intramuscular o intravenosa. (Wilman et al., 2020)

2.1.1.4 Cefalosporinas de Cuarta Generación.

Su estructura bipolar le confiere una carga positiva y negativa, facilitando su penetración a través de las porinas y aportando una mayor acción frente a las betalactamasas. Por ejemplo, cefepime (FEP) tiene un espectro antibacteriano más amplio, incluida la actividad contra bacterias Gram positivas aerobias y Gram negativos resistentes. Es importante mencionar que este grupo de cefalosporinas presenta estabilidad frente a hidrólisis por betalactamasas plasmídicas y cromosómicas, lo cual sugiere su utilidad en infecciones resistentes a

cefalosporinas (Wilman et al., 2020). Entre las cefalosporinas de cuarta generación incluyen fármacos como: cefepime, cefpirone, cefpiramide, ceftazopran.

2.1.2 Carbapenémicos.

Este tipo de antibióticos tienen un espectro de acción más amplia actividad y una mayor resistencia a las enzimas betalactamasas, incluidas las BLEE. En este caso, los carbapenémicos se utilizan generalmente en tratamientos alternativos para tratar infecciones producidas por bacterias multirresistentes. Su mecanismo de acción es similar a los betalactámicos tradicionales, sin embargo, su efectividad y estabilidad son mayores (Bucheli, 2021).

Para que el carbapenémico puede ejercer su acción, en el caso de las bacterias Gram negativas debe atravesar la membrana externa a través de porinas inespecíficas, dependiendo de la estructura y mecanismo de acción de cada antibiótico carbapenémico. Algunos los dividen en dos grupos según tengan o no actividad frente a *P. aeruginosa*, perteneciendo al primer grupo: imipenem, meropenem y doripenem y al segundo grupo: ertapenem que se comporta como bacteriostático (Moreno, 2013).

2.2 Resistencia Antimicrobiana.

La resistencia a los antibióticos es la capacidad de un microorganismo de resistir los efectos de un antimicrobiano, ya sea por selección natural o como producto de mutaciones ocurridas al azar a lo largo del tiempo (Calderón y Aguilar, 2016). Como resultado, los medicamentos se vuelven ineficaces y las infecciones son más difíciles de controlar por la propagación de estos microorganismos (García et al., 2022).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha declarado a la resistencia antimicrobiana como una de las 10 principales amenazas a nivel mundial (Raza et al., 2022). Además, se sospecha que en los próximos años 30 años se producirán 10 millones de muertes por esta causa, superando al cáncer con 8.2 millones (Giménez et al., 2020). El uso indiscriminado de antibióticos en personas como en animales de producción, la falta de agua potable y el saneamiento deficiente son algunos de los principales factores que contribuyen al desarrollo de resistencia a los antimicrobianos (Figura 1).

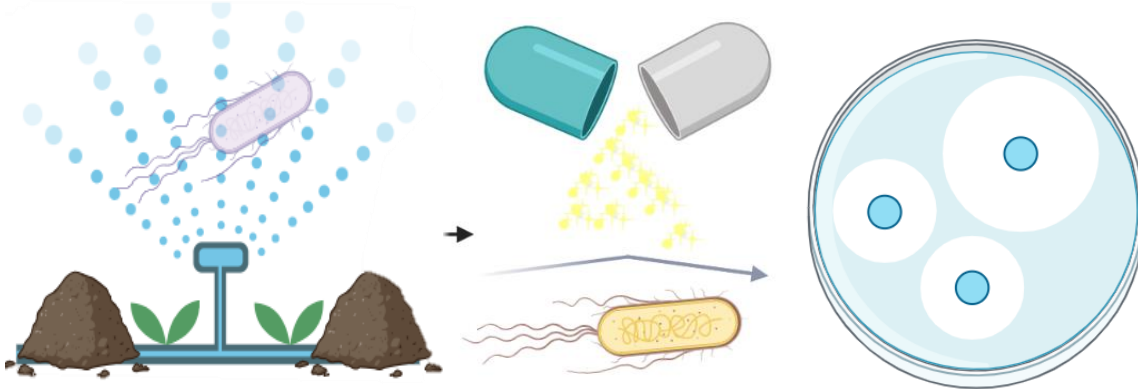
Actualmente, la propagación de bacterias ambientales y clínicamente resistentes es de gran interés para los investigadores (FAO, 2023) porque las personas y el ganado pueden estar expuestos con bacterias resistentes a través de los alimentos, el agua o el suelo. Por lo tanto, representa una amenaza creciente en la salud humana, sanidad animal, y a la seguridad alimentaria global (OIE, 2019).

De manera similar, el aumento de la resistencia a los antimicrobianos tiene un impacto importante en las economías internacionales y sus sistemas de salud, ya que afecta la productividad de los pacientes o de quienes los cuidan, prolongando las estancias hospitalarias, los costos médicos y la mortalidad (Valdés, 2017). Hasta la fecha, los esfuerzos para combatir este problema se han centrado en mejorar el diagnóstico, las prácticas de prescripción de antibióticos y las estrategias de prevención a infecciones (Christaki et al., 2020).

Ante el aumento de la resistencia a los antimicrobianos, en los últimos años se ha consolidado la necesidad de adoptar un enfoque interdisciplinario y multisectorial en el manejo de la salud de los seres humanos, los animales y los ecosistemas. A nivel internacional se denominó “Una Salud” (“One Health”), a una perspectiva enfocada a diseñar e implementar prácticas, programas, políticas, legislación e investigación, con el fin de lograr mejores resultados a nivel de salud (Zunino, 2018).

Uno de los retos en varios países por “One Health” se basa en las enfermedades transmisibles entre personas y animales, por el elevado riesgo que representan para la salud pública a nivel mundial. Esto se enfatiza con el cambio climático y determinados comportamientos humanos, que aumentan las oportunidades para que los patógenos colonicen nuevos territorios y evolucionen hacia nuevas formas (Rosell, 2021). De tal manera “One Health” realizó un enfoque en el que múltiples sectores colaboran y toman medidas colectivas para minimizar la propagación de la resistencia a los antibióticos y lograr mejores resultados relacionados a la salud, inocuidad de los alimentos y el control de zoonosis (García et al., 2022).

Figura 1. Resistencia bacteriana.



2.3 Mecanismos de Resistencia

Desde la era de los antibióticos y a medida que se han ido creando nuevos antimicrobianos, los microorganismos han logrado perdurar a los ataques de agentes mediante diferentes tipos de modificaciones y/o adaptaciones (Calderón y Aguilar, 2016). Se relaciona a un aspecto evolutivo que se han identificado en tres niveles de diseminación según el vector: bacterias (diseminación clonal), plásmidos (transferencia replicativa) o genes (transposición replicativa) (Bustos et al., 2017)

De manera general, la resistencia natural o intrínseca es una propiedad específica para sobrevivir, mientras que la resistencia adquirida es un verdadero cambio en la composición genética y puede ser de carácter permanente. En consecuencia, los mecanismos son variados destacando entre ellos los siguientes:

- a) Modificaciones bacterianas que impiden la llegada del antibiótico al punto diana: Producen mutaciones en las porinas de la pared que impiden la entrada de ciertos antibióticos (betalactámicos) o alteran los sistemas de transporte (aminoglucósidos en los anaerobios).
- b) Alteración por parte de la bacteria de su punto diana, dificultando la acción del antibiótico: Aquí podemos contemplar las alteraciones a nivel del ADN girasa (resistencia de quinolonas), del ARNr 23S (macrólidos) y de las enzimas PBPs (proteínas fijadoras de penicilina) necesarias para la formación de la pared celular (resistencia a betalactámicos) (Acosta y Vargas, 2018).

- c) Bombas de eflujo: Luego de su ingreso a través de la membrana externa de bacterias Gram negativas, el antibiótico es expulsado por eflujo activo desde el espacio periplásmico al exterior de la célula (Lopardo, 2020)
- d) Inactivación del antibiótico por enzimas: La bacteria produce enzimas que inactivan al antibiótico; las más relevantes son las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), las AmpC y las Carbapenemasas.

Asimismo, una cepa bacteriana puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o muchos antibióticos y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos (Hasan y Al-Harmoosh, 2020). Existen varios mecanismos de generación de farmacoresistencia que se dividen en tres categorías: (a) mutación clásica donde basa su mutación a través de la replicación del genoma o el reordenamiento intragenómico, (b) la transferencia horizontal de genes, principalmente mediante la conjugación bacteriana y (c) la respuesta adaptativa que puede modificarse en función de la comunidad microbiana (Wallace et al., 2020).

2.3.1 Genes de Resistencia en bacterias.

Los genes de resistencia han surgido por mutaciones puntuales que alteran su centro activo o adquisición de plásmidos que llevan genes que les proveen protección contra antibióticos. Muchas de las especies poseen una amplia variabilidad de genes de resistencia a diferentes clases de antibióticos con un gran potencial de transferencia horizontal entre ellas (López et al., 2016). *Escherichia coli* típicamente, adquiere estos genes de resistencia de otros miembros de Enterobacterales y se ha observado en toda Europa altas tasas de resistencia a aminopenicilinas, fluoroquinolonas, aminoglucósidos y cefalosporinas de tercera generación. Aunque la resistencia a los carbapenémicos es rara en las cepas invasivas de *E. coli*, se demostró que la situación general empeoró desde el 2018 (Velo et al., 2019).

Los genes de resistencia a BLEE están regulados por mutaciones codificadas por los genes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* y *bla_{CTX-M}*. Pueden ser transmitidos por plásmidos y se encuentran en transposones o integrones, lo que facilita su movilización con otro mecanismo de resistencia. Por lo tanto, las mutaciones cambian la configuración de aminoácidos de las proteínas codificadas, lo que otorga la capacidad de hidrolizar una gama más amplia de antibióticos

betalactámicos (Tewari et al., 2022). Se ha informado que las BLEE tipo CTX-M son las más ampliamente diseminadas en *E. coli*, debido a que ciertas variantes de esta enzima suelen utilizarse como marcadores en la presencia de ciertos clones prevalentes en diferentes nichos ecológicos. (Yauri, 2021).

2.3.2 *Betalactamasas de espectro extendido (BLEE).*

Las BLEE son definidas como enzimas que fenotípicamente se caracterizan por conferir resistencia a penicilinas, monobactámicos (aztreonam), cefalosporinas, (incluidas las de tercera y cuarta generación), oximino-cefalosporinas y carbapenémicos. Pueden ser inhibidas por el ácido clavulánico u otros inhibidores de betalactamasas como el tazobactam y el sulbactam (Rocha, 2019). Las BLEE han sido reportadas en múltiples especies de bacterias Gram negativas como *Klebsiella spp.* y *Escherichia coli*, siendo las bacterias más comúnmente asociadas.

Estas betalactamasas pertenecen a la clase molecular A de Ambler y entre ellas se encuentran las de tipo TEM y SHV (derivadas de enzimas con menor espectro de hidrólisis), la familia CTX-M (procedente de betalactamasas cromosómicas del género *Kluyvera*), y otras menos prevalentes como PER, VEB, BES, GES, TLA y SFO, incluidas todas ellas en el grupo funcional 2be de Bush y Jacoby. En los años 80 se describió por primera vez la β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) (García, 2013).

Con base en el efecto inhibitorio del ácido clavulánico, se han desarrollado diferentes pruebas fenotípicas para la detección de BLEE. Entre ellas destaca la técnica de difusión en disco, donde se sospecha la presencia de BLEE no solo por la resistencia o disminución de los halos de inhibición, sino también por el efecto sinérgico producido (Navarro et al., 2011). Esta detección en el laboratorio es de suma importancia en el laboratorio, debido a que la presencia de estas enzimas involucra un cambio de interpretación de algunos antibióticos betalactámicos, sin importar el halo de inhibición o la concentración inhibitoria mínima (CIM) obtenida (Jiménez A, 2011)

Las enzimas BLEE clínicamente más importantes son las de espectro extendido, las betalactamasas de clase C y las carbapenémicas (Rivera et al., 2014). La literatura científica reciente ha reportado que las enterobacterias resistentes a carbapenémicos ya han sido

catalogadas ya una "amenaza urgente" debido a la producción de BLEE (Wallace et al., 2020).

2.3.3 *Betalactamasas de tipo AmpC.*

Las AmpC son serin-betalactamasas pertenecientes al grupo 1 de la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros, se encuentran presentes de forma natural en diversas enterobacterias y en bacilos Gram negativos no fermentadores. Estas enzimas son capaces de resistir la inhibición por ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Por tanto, se diferencian de las BLEE porque son susceptibles a las cefalosporinas de cuarta generación (Gil et al., 2014).

De igual manera, no poseen un método estandarizado por el Instituto de Estándares de Laboratorios Clínicos (CLSI, siglas en inglés), para su detección fenotípica como es en el caso de las BLEEs. Una característica de las enzimas AmpC es que no tienen efecto, por sí solas, sobre cefalosporinas de cuarta generación, ni sobre carbapenémicos (García et al., 2014).

Las AmpC cromosómicas se expresan en niveles muy bajos, debido a que el gen AmpC permite la resistencia a varios antimicrobianos betalactámicos, solo cuando este gen sufre mutaciones y cambios genómicos después de la exposición al antibiótico (Darphorn et al., 2021). Se han descrito en algunas especies, de las que se destaca *E. coli* con una relevancia tanto epidemiológica como clínica, dando lugar a fracasos terapéuticos. En el caso de las AmpC de tipo plasmáticas, tienen una gran capacidad para movilizarse, lo que constituye un importante reservorio de varias infecciones (Mendieta et al., 2021).

2.3.3.1 *BLEE CTX-M*

El grupo CTX-M fue descrito por primera vez a partir de un aislado de *Escherichia coli* en el año 1989 en Munich, Alemania. Debe su nombre a la capacidad de producir la cefotaximasa, enzima que confiere resistencia a la cefotaxima. En los últimos años se han identificado al menos 172 variantes de CTX-M y tienen actividad BLEE intrínseca movilizadora por su ancestro cromosómico en *Kluyvera*. Este es el grupo de las BLEE de mayor reporte mundial e importancia clínica, ya que domina en patógenos como *Escherichia coli* y *Klebsiella spp* en infecciones nosocomiales (Rivera et al., 2015)

Las BLEEs tipo CTX-M pertenecen a la clase molecular A o al grupo funcional 2be, que incluye al menos seis linajes: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 CTX-M-25 y KLCU; que difieren entre sí por la homología de su secuencia aminoacídica en un >10%. Por ejemplo, de estos linajes o grupos las variantes blaCTX-M-15 y blaCTX-M-14 (grupo 1 y 9, respectivamente) son actualmente los genotipos dominantes que se encuentran en todo tipo de ambientes (aguas, alimentos, animales y humanos) (Navarro, 2020).

De hecho, la movilización de los genes BLEE tipo CTX-M conduce a una rápida dispersión en grupos de plásmidos conjugativos, que circulan en enterobacterias como: *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, entre otros. La combinación de plásmidos que codifican CTX-M con linajes virulentos en *E. coli* ha generado una serie de clones virulentos y multirresistentes denominados "de alto riesgo" (Tewari et al., 2022).

2.3.3.2 BLEE KPC

Las enzimas KPC (*Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas), pertenecen a la clase molecular A y son las más comunes del mundo. Se consideran como el grupo de betalactamasas más versátiles y las de mayor diversidad y distribución. Hidrolizan eficazmente penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos; además, son parcialmente inhibidos por el ácido clavulánico y el tazobactam. Actualmente, se conocen 23 variantes (Rada et al., 2019). La primera variante (KPC-1) se describió originalmente en el 2001 mediante el aislamiento de *K. pneumoniae* en Carolina del Norte. De esta manera las enzimas KPC se propagaron rápidamente a través de plásmidos en otras enterobacterias y en bacterias Gram negativas no fermentadoras.

Las cepas productoras de KPC pueden presentar diferentes niveles de resistencia más elevados a los carbapenémicos, debido a mecanismos adicionales como diferentes grados de expresión de porinas y bombas de expulsión asociadas con la producción de betalactamasas de espectro extendido o AmpC (González et al., 2017). Además, su actividad in vitro es inhibida por el ácido clavulánico y tazobactam (Pesantez y Sanchez, 2021).

2.3.3.3 BLEE NDM

Las enzimas NDM (metalo-betalactamasas) confieren una alta resistencia a la mayoría de los antibióticos y tienen un gran efecto negativo en los tratamientos. Esta familia de enzimas NDM pertenece a la clase molecular B y comprende 16 variantes. Los genes bla-NDM predominan en *K. pneumoniae* y *E. coli* (Navarro, 2020).

Las enzimas NDM son resistentes a los carbapenémicos y a todos los antibióticos probados, a excepción de la colistina (Rada et al., 2019).

Un claro ejemplo de la aparición de bacterias multirresistentes con diferentes mecanismos es la enzima NDM-1. Se ha descrito que NDM-1 está presente en diferentes géneros y se moviliza fácilmente entre diferentes cepas bacterianas. Además, se diferencia de otras enzimas por su localización celular (lipoproteína anclada a la superficie interna de la membrana externa de los organismos Gram negativos), lo que provoca graves daños en el ámbito de salud pública (Castañeda et al., 2016).

2.4 *Escherichia coli*.

Pertenciente a la familia Enterobacteriaceae, se caracteriza por ser una bacteria mesófila (35-43°C) en forma de cocobacilos Gram negativos, no esporulantes y en condiciones óptimas su tasa de crecimiento es de 20 minutos (Rovira, 2015). Pueden medir 1 µm de longitud por 0.35 µm de ancho y se consideran aerobios facultativas porque pueden activar o suprimir enzimas metabólicas necesarias, dependiendo de los niveles de oxígeno y el hábitat en el que se encuentren (Terrazas, 2019).

E. coli se presenta en diversas formas en la naturaleza, desde cepas comensales hasta aquellas patógenas que requieren un huésped. Al poseer finos y largos filamentos de naturaleza proteica, pueden adherirse fácilmente a los tejidos, comúnmente en la microbiota gastrointestinal de personas y animales. Sin embargo, puede transmitirse a través del consumo de alimentos contaminados, como productos cárnicos (molidos crudos o poco cocidos), leche cruda, verduras (espinacas, lechuga, ensalada de col), animales infectados y brotes crudos contaminados como cuerpos de agua, estanques o abrevaderos (OMS, 2018)

Debido a esta contaminación, estos microorganismos son causantes de muchas enfermedades, entre ellas la diarrea, disentería, peritonitis bacteriana espontánea y otras enfermedades extraintestinales, como neumonía, bacteriemia, insuficiencia renal, colitis hemorrágica, shock séptico. Las enfermedades causadas por *E. coli* suponen una carga importante para los pacientes y el sistema sanitario, por lo que la detección y el tratamiento oportunos son esenciales (Mueller, 2023).

Por otro lado, *E. coli* es uno de los organismos más estudiados para los científicos, porque es posible encontrarlo en diversos nichos (ambientales y clínicas) y su material genético puede resolver varios paradigmas a futuro (BBC, 2011). De tal manera, *E. coli* ha sido con frecuencia la especie de elección para estudios relacionados a genética molecular, fisiología bacteriana y secuenciación dada su facilidad de crecimiento (Cabal, 2016). Por ejemplo, se ha descubierto que *E. coli* debido a su notable plasticidad y dinámica en su genoma puede contribuir al estudio de la diversidad genética y fenotípica en la naturaleza siendo una cepa “modelo” para la investigación (Blount, 2015).

2.5 Fuentes de Diseminación de resistencia a antibióticos

La atención mundial a la RAM ha estado dominada por un enfoque en los sectores de salud y la agricultura. Por lo tanto, la salud de las personas y los animales está directamente relacionada con el medio ambiente, siendo el uso inadecuado de los antimicrobianos el causante de la propagación de genes de resistencia (Pardo et al., 2018). Estos genes han sido ampliamente identificado en diversos entornos ambientales como la superficie reservorios de agua y agua subterránea (Raza et al., 2022).

2.5.1 Agua.

Las bacterias potencialmente patógenas se liberan constantemente en fuentes de agua y albergan genes de resistencia a antibióticos que se insertan en plataformas genéticas móviles (plásmidos, transposones e integrones) capaces de propagarse entre las comunidades bacterianas que viven en el agua (B. Reddy y Dubey, 2019). Según la FAO, en países de ingresos medianos-bajos, las aguas residuales y domésticas pueden convertirse en medios acuáticos con un alto porcentaje de genes de resistencia antimicrobiano.

En algunos estudios la resistencia es transitoria, pero han sido encontrados en fuentes de agua incluso subterránea y potable dando una idea a la dimensión del problema. La mayoría de los metabolitos o productos de degradación de los antibióticos administrados son solubles en agua, por tanto, alrededor de 90% de la dosis es eliminada por orina y hasta 75% en heces. En otros casos se observan en aguas residuales y plantas de tratamiento la presencia de bacterias resistentes que posiblemente, ingresen en la cadena alimenticia directamente por irrigación y faciliten la dispersión en los ecosistemas acuáticos (Sulis et al., 2022). Esta información nos indica la importancia de la relación con la calidad del agua y la salud pública.

2.5.2 Canal de Riego.

Debido a la escasez y el costo del agua, los agricultores urbanos generalmente realizan el riego con aguas residuales no tratadas, ya que más del 80% de las aguas residuales generadas es descargado sin tratar en el medio ambiente; esto es a la vez fácilmente accesible y tiene capacidad fertilizante. Aproximadamente, el 50% de la población mundial depende de fuentes de agua contaminada, incluso para riego de agricultura, exponiendo a los seres humanos y animales a diversas enfermedades entéricas causadas por bacterias patógenas, protozoos, helmintos etc. (Bougnom y Piddock, 2017).

2.5.3 Vegetales.

Las enfermedades relacionadas con los alimentos de origen vegetal son cada vez más comunes, para ello la aplicación de programas de inocuidad de alimentos a través de la de las buenas prácticas agrícolas, son de vital importancia para reducir los posibles riesgos de contaminación por factores físicos, químicos y biológicos que se presenten durante la producción y distribución (Giménez et al., 2020). Estos factores pueden afectar la inocuidad de los productos vegetales frescos posterior a la cosecha, debido a la contaminación de los utensilios para pelarlos o cortarlos, el agua de riego y la tierra de cultivo.

2.5.4 Suelo.

La contaminación microbiana del suelo de cultivo es considerada una de las principales fuentes que ocasionan la pérdida de la inocuidad de alimentos. La contaminación de los productos puede ocurrir en el campo por suelo contaminado, por exposición a agua

contaminada mediante el riego, la aplicación de pesticidas o por deposición de heces por parte del ganado u otros animales salvajes (Giménez et al., 2020)

2.5.5 Fuentes Hospitalarias.

Un probable impacto también se centra en el deficiente saneamiento del cuidado personal y sanitario en los centros médicos. El incumplimiento de las normas de bioseguridad, falta de regulaciones y otros factores puede aumentar considerablemente la exposición de microorganismos resistentes en el medio ambiente (Sulis et al., 2022).

2.6 Problemática/Actualidad.

El informe mundial de la Organización Mundial de la Salud (2016) sobre la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos, reveló que es importante el conocimiento sobre la propagación de la resistencia en los seres humanos y animales a través de los alimentos y el agua; mediante investigaciones que permitan el desarrollo de nuevas herramientas, y reglamentos destinados a combatir la resistencia a los antimicrobianos.

En Ecuador, el Instituto Nacional de Investigaciones en Salud Pública (INSPI) monitoreó la resistencia bacteriana hasta el año 2017, reportando el informe del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos con los porcentajes de resistencia para *Escherichia coli*. Esta investigación se realizó en pacientes con infecciones bacterianas atendidos en hospitales o centros de salud rurales, que son una posible fuente de cultivos bacterianos no identificados de patógenos multirresistentes a los antibióticos, especialmente por la falta de información sobre el análisis de patrones de resistencia en estos microorganismos y el manejo de terapia antibiótica empírica (Ross et al., 2020).

2.7 Detección y análisis de genes de resistencia mediante PCR y secuenciación Sanger.

2.7.1 Amplificación de ADN por PCR.

La PCR es una de las técnicas más utilizadas en la detección e identificación de bacterias causantes de la resistencia. Destaca como el método de diagnóstico molecular más aplicado en el área de alimentos y, recientemente la PCR en tiempo real y múltiple, han sumado ventajas por una mayor velocidad en la obtención de resultados de genes de virulencia. Esta técnica posteriormente se acompaña de la detección de la amplificación mediante gel de

agarosa con un intercalante inespecífico fluorescente (Palomino y González, 2014). Sin embargo, en otros casos utilizan *microarrays* de ADN para la detección de patógenos

2.7.2 Secuenciación Sanger.

La Secuenciación Sanger es una técnica molecular utilizada en varios estudios en los últimos años. Los avances en la secuenciación del ADN han posibilitado secuenciar un genoma bacteriano y obtener una gran cantidad de datos. Posteriormente, los programas bioinformáticos se encargan de su procesamiento y análisis (Perez, 2017).

La secuenciación de los productos amplificados mediante PCR permite identificar bacterias y compararlas con secuencias ya conocidas que se encuentran en múltiples bases de datos. (Mellado, 2020). Desde 1977, la secuenciación Sanger ha sido la prueba estándar para la detección de variantes en el ADN para su uso en el diagnóstico de enfermedades (Rubio et al., 2020).

Esta técnica desarrollada por el bioquímico británico Frederick Sanger, se basa en la acción del ADN polimerasas, un iniciador (primer) y cuatro nucleótidos modificados o dideoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs), que carecen del hidroxilo en el carbono 3' del azúcar. Los fragmentos son separados por electroforesis, corriendo cada reacción en carriles independientes adyacentes, obteniéndose así un patrón de bandas a partir del cual se puede leer las secuencias. Esto determina la información genética y como se regula su expresión (Ongay y Huerta, 2021).

La ventaja de realizar la secuenciación de Sanger es que las reacciones son más “puras” y con menos contaminantes que puedan afectar la resolución del gel. Sin embargo, tiene sus limitaciones y se han desarrollado diferentes técnicas de secuenciación de nueva generación, mucho más rápidas y económicas (Ongay y Huerta, 2021).

CAPÍTULO III

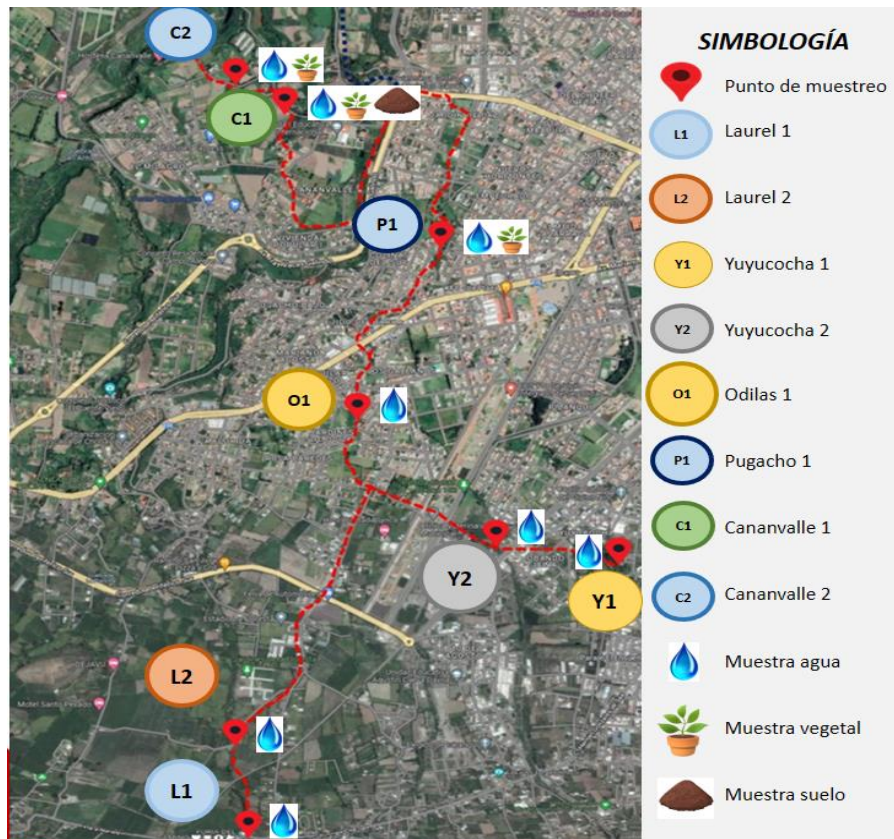
METODOLOGÍA

3.1. Descripción del área de estudio

Se determinó el recorrido del canal de riego Cananvalle ubicado en la ciudad de Ibarra, provincia de Imbabura (Anexo 1). Se evaluaron tres diferentes sitios geográficos (inicio, medio, final) del canal. En total se analizaron 8 puntos del canal: Inicio (Laurel 1, Laurel 2, Yuyucocha 1, Yuyucocha 2), medio (Odilas, Pugacho) y final (Cananvalle 1, Cananvalle 2) (Figura 2).

Esta investigación involucró el agua del canal de riego, así como, vegetales de los predios cercanos y suelo agrícola. Los análisis se llevaron a cabo en los laboratorios de Biotecnología Aplicada y Biotecnología Vegetal del Campus San Vicente de Paúl de la Universidad Técnica del Norte.

Figura 2. Mapa de localización de Cananvalle-Ibarra



3.2 Material biológico.

3.2.1 Recolección de muestras de agua, vegetales y suelo.

Mediante un muestreo al azar, se recolectaron muestras de agua desde una profundidad de 0.5 m (Jørgensen et al., 2017) en los 8 puntos del canal de riego, empleando recipientes estériles de 250 ml. Se tomó un total de 100 ml de muestra en cada recipiente, realizando tres repeticiones (Quingaluisa, 2019). Las muestras fueron recolectadas y transportadas al laboratorio de Biotecnología Aplicada de la UTN.

Para la recolección de las muestras vegetales se tomó alrededor de 250 g de dos tipos diferentes: cilantro y lechuga (Plasencia, 2020). El muestreo se realizó al azar en los puntos del canal de riego: Pugacho, Cananvalle 1 y Cananvalle 2 (Anexo 1). Se consideró solamente el material vegetal óptimo para el consumo (Moreno et al., 2020).

Se recolectó el suelo agrícola en el punto Cananvalle 1. Se tomaron muestras de la parte superficial del suelo a 10 cm de profundidad con tres repeticiones (Mau et al., 2011). Posteriormente, las muestras vegetales y de suelo se colocaron en fundas plásticas con sellado hermético para mantener la humedad adecuada y ser procesadas (Agrocalidad, 2018).

3.2.2 Preparación de medios de cultivo.

Se empleó el medio de cultivo selectivo y diferencial TBX (Tryptona bilis X-glucorónido) (TM Media®) y se suplementó con cefotaxima (Vitalis®) a una concentración de 3 µg/ml (Plasencia, 2020), para la obtención únicamente de aislados de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de tercera generación (Dunjo et al., 2022).

3.2.3 Procesamiento de las muestras vegetales y de suelo.

De cada muestra vegetal se pesaron 25 g por cada repetición. Se colocó cada una de las muestras en matraces Erlenmeyer con 225 ml de agua peptonada (TM Media®) y se homogeneizaron durante 30 min en un agitador orbital (Thermo Scientific™) para el desprendimiento de microorganismos (López et al., 2009). Esta metodología también se empleó con la muestra de suelo para los análisis microbiológicos respectivos.

3.2.4 Suspensión y filtración de muestras

Se analizaron un total de 100 ml de las muestras, tanto sin dilución y con diluciones seriadas de 0.1 y 0.01 con 10 ml, mediante filtración al vacío utilizando el equipo Roker 300 ®. Las diluciones seriadas fueron aforadas a 100 ml con agua destilada. De cada muestra se realizaron 3 repeticiones.

A través de una membrana de filtración de celulosa de poro 0.45 μm , se dejó pasar todo el líquido, de tal manera que logre la recuperación de los microorganismos (Kim et al., 2015). Posteriormente, se removió con pinzas estériles como lo demuestra la Figura 3 (López, 2015).

Figura 3. Filtración de muestras y aislamiento.



3.2.5 Aislamiento de *Escherichia coli* resistentes a cefalosporinas de tercera generación.

Se colocaron las membranas de filtración en medio de cultivo TBX suplementado con cefotaxima al 3 $\mu\text{g/ml}$, evitando aire atrapado en la interfaz membrana medio de cultivo y se dejó en incubación durante 24 horas a 35° C en posición invertida. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el recuento de colonias (UFC) y se registraron los datos de acuerdo con el factor de dilución (Naturales et al., 2021). El medio de cultivo utilizado permitió la diferenciación de *E. coli* del resto de coliformes, debido a la presencia de colonias con un color azul-verdoso por la actividad glucuronidasa, específica para *E. coli* (Castillo, 2018).

Adicionalmente, se tomaron dos colonias al azar de cada cultivo y se realizaron resiembras mediante la técnica de estría por desgaste, con la finalidad de obtener cepas puras. A partir del cultivo obtenido, se inocularon en tubos con caldo de soja y tripticaseína (TSB) y se incubaron durante 24 horas a 35° C, para los ensayos posteriores.

3.2.6 Conservación de *Escherichia coli* BLEE.

Con las cepas aisladas se preparó cultivos bacterianos en microtubos estériles de caldo TSB y glicerol al 30%. Se homogeneizó la muestra y se almacenó en congelación a -20°C. Todas las muestras obtenidas constituyeron el cepario del proyecto (Pérez y Sosa Espinosa, 2010).

3.3 Identificación fenotípica y molecular de *E. coli*

3.3.1. Tinción Gram.

Para la identificación morfológica, se realizó una prueba de tinción Gram de acuerdo con la metodología (Castillo, 2018), preparando un frotis bacteriano para el procedimiento. Se añadió cristal violeta, lugol, etanol y safranina, secuencialmente, quitando el excedente en cada lavado. Se observaron las placas en el microscopio con aumento de 40x y 100x empleando aceite de inmersión.

3.3.2 Identificación de *Escherichia coli* mediante pruebas bioquímicas.

Con los aislados que presentaron morfología característica de *E. coli* en la microscopía, se realizó la evaluación de su capacidad para metabolizar diferentes sustratos. Para garantizar la pureza de las colonias se realizó un segundo subcultivo y se utilizaron tres pruebas bioquímicas de identificación (TSI, SIM y Simmons Citrato). Se detalla en la Tabla 1, las características metabólicas del microorganismo (Gonzalez, 2013a).

3.3.2.1 Agar Triple Azúcar Hierro (TSI).

Se realizó la técnica de punción mixta estriado en pico de flauta y se dejó en incubación durante 24 horas a 35° C. (Calipuy et al., 2017). Esta prueba nos permitió observar la capacidad de fermentación de lactosa, sacarosa y/o glucosa, con una reacción ácida en el pico

de flauta de color amarillo (A/A), producción de gas y la ausencia de ácido sulfhídrico, propio de *E. coli* (León y Vázquez, 2018).

3.3.2.2 Medio Sulfhídrico indol movilidad SIM.

La siembra se realizó mediante la técnica de punción recta en el centro del tubo y se incubó a 35° C, por 24 horas (Álvarez, 2017). Posteriormente, se añadió dos gotas del reactivo de Kovács al cultivo de bacterias, esperando la formación de un anillo rojo en la superficie, indicando la producción de indol, característico del microorganismo de interés. (H. A. Lopardo et al., 2011).

3.3.2.3 Agar Simmons Citrato.

Se procedió a estriar el pico de flauta con un movimiento en zigzag y se incubó a 35° C, por un lapso de 24 horas (Álvarez, 2017). Se observó el color verde inicial del medio, indicando que la bacteria no utiliza el citrato como fuente de carbono, específico de *E. coli*.

Tabla 1

Parámetros para identificación E. coli mediante pruebas bioquímicas. Interpretación de los resultados: A/A: Superficie ácida color amarillo/Profundidad ácida color amarillo ; + señala que el parámetro es positivo; - indica que el parámetro es negativo para el microorganismo.

Pruebas bioquímicas	Parámetros	<i>Escherichia coli</i>
TSI	<i>Superficie / Profundidad</i>	A/A
	<i>Gas</i>	+
	<i>SH2</i>	-
SIM	<i>Movilidad</i>	+
	<i>Indol</i>	+
	<i>SH2</i>	-
Simmons citrato	<i>Crecimiento</i>	-
	<i>Color de medio</i>	Verde

3.2.9 Identificación de *Escherichia coli* mediante pruebas moleculares.

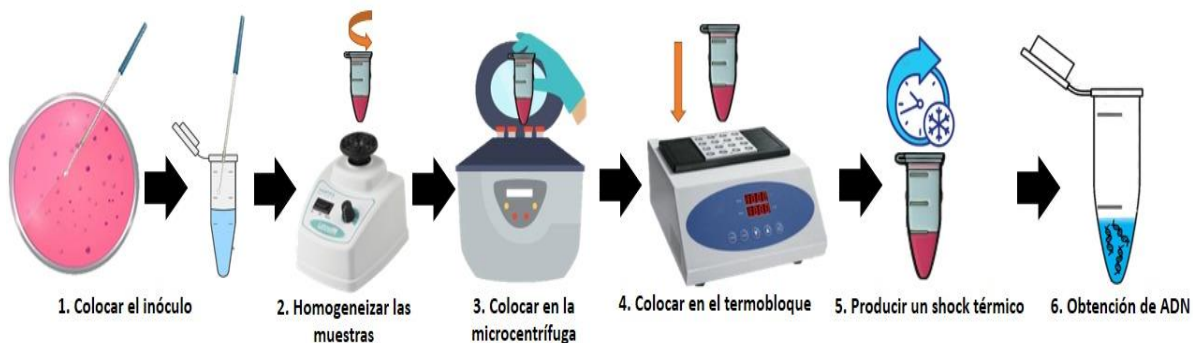
3.2.9.1 Extracción de ADN.

Mediante la técnica de extracción por ebullición, se tomaron colonias en cantidad abundante de cada cepa pura y se colocaron en tubos eppendorf con 1 ml de agua destilada

estéril. Se centrifugó durante 2 min a máxima velocidad para lavar la muestra y sedimentar las células microbianas (Bougnom et al., 2019). Consecutivamente, se realizó un segundo lavado añadiendo 1 ml de agua destilada estéril y repitiendo el paso anterior durante 1 min a máxima velocidad en la centrifuga. Se resuspendió con 500 µl de agua destilada estéril y una vez homogenizadas las muestras, se colocaron en el baño de calor seco a 96° C por 10 min y posteriormente a refrigeración durante 10 min (Figura 4).

Posteriormente, se centrifugó a 14,800 rpm durante 1 min, obteniendo el sobrenadante con el ADN de cada aislado en tubos estériles previamente etiquetados. Finalmente, todas las muestras se almacenaron a -20°C (Ortega, 2017).

Figura 4. Extracción de ADN bacteriano por ebullición.



3.2.9.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para el análisis molecular se incluyó como control una cepa de *E. coli* BLEE del cepario del laboratorio de Biotecnología Aplicada. La confirmación de especie se realizó por PCR convencional. Se preparó una solución madre (1x) para un volumen de reacción final de 25 µl; utilizando 12.5 µl de la polimerasa comercial Mix GoTaq® Green Master Mix (2x), 0.4 mM de los primers específicos: UAL-754 (5'-AAAACGGCAAGAAAAAGCAG-3') y UAR-900 (5'-ACGCGTGGTTACAGTCTTGCG-3'), para detectar el gen *uidA*, definido para la especie *Escherichia coli*.

Además, se añadió 5 µl del ADN bacteriano y se utilizó agua libre de nucleasas (Promega®) como control negativo. Se programó el ciclo de la PCR y se colocaron los tubos en el termociclador (SimpliAmp®) como se detalla en la tabla 2.

Tabla 2.

Programación de PCR para confirmación de especie.

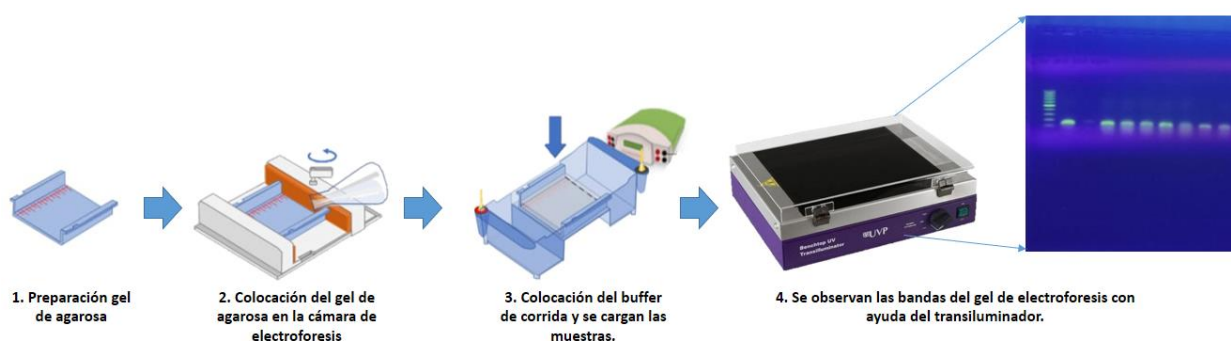
Proceso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	95°C	1 minuto
Anillamiento	50°C	30 segundos
Extensión	72°C	30 segundos
N° de repetición por ciclos	30x	
Conservación	4°C	Tiempo indefinido

3.2.9.3 Electroforesis.

Los productos obtenidos tras la amplificación se visualizaron por la técnica de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% en tampón TBE 1X. Se añadió de SYBR Safe (Invitrogen®) en un volumen de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y se vertió la preparación homogenizada en el molde de electroforesis hasta solidificarse durante 15 min. Una vez polimerizado el gel, se colocó dentro de la cámara de electroforesis y se cubrió con solución tampón TBE (1X). Cada muestra fue colocada en su pocillo correspondiente (Galindo-Méndez, 2018).

Para la evaluación de fragmentos se utilizó el marcador de peso molecular TrackIt™ 100 bp DNA Ladder (Invitrogen®). Se programó la fuente de potencia (Labnet®) a 110 V durante 43 min y se procedió a identificar las bandas electroforéticas en el transiluminador (Cleaver Scientific®). Por último, se fotodocumentó los resultados de cada aislado (Figura 5).

Figura 5. Electroforesis



3.3. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana.

3.3.1 Preparación del medio de cultivo.

Para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se empleó el medio de cultivo Mueller Hinton II (BD®), considerado como el medio estándar para elaboración de antibiogramas. Se preparó siguiendo las recomendaciones del fabricante. Consecutivamente, se esterilizó mediante calor húmedo con presión a 121°C y 1.5; para distribuir en placas de Petri estériles (Britania, 2016).

3.3.2 Preparación del inóculo.

Todos los aislados identificados como *E. coli* fueron sembrados en placas de agar MacConkey suplementado con cefotaxima al 3 µg/ml, se incubaron a 35°C durante 24 horas. Previamente, se prepararon tubos con medio de cultivo TSB y con ayuda de un asa estéril se colocaron de 3 a 5 colonias de la cepa pura. Posteriormente, se homogenizó cada tubo y se midió la concentración de células viables con ayuda del densitómetro (bioSan ®), hasta conseguir una turbidez de 0.5 en la escala McFarland, que representa una concentración de células bacterianas de 1.5×10^8 UFC/ml (Lösch & Merino, 2012)

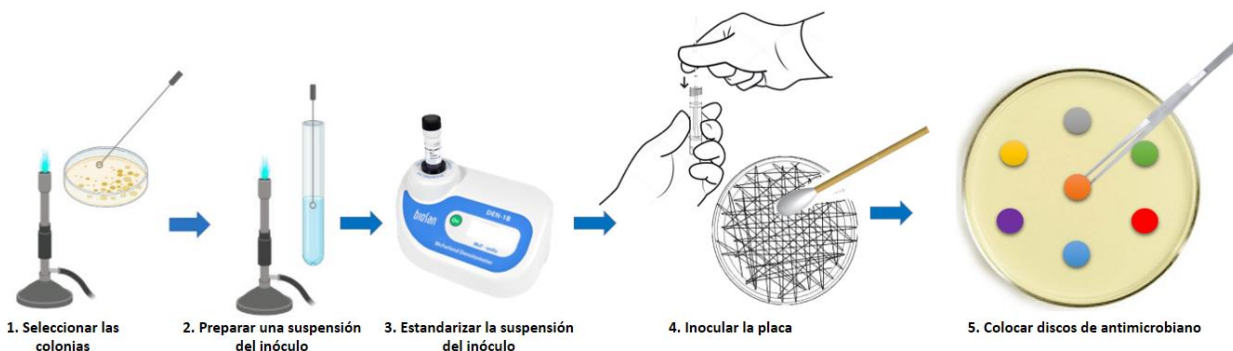
3.3.3 Antibiogramas.

Para la inoculación de las placas con medio de cultivo Mueller Hinton, se empleó hisopos estériles, tomando una muestra a partir de los cultivos en TSB con 0,5 en la escala McFarland. Procurando eliminar el exceso del cultivo se realizó una siembra tipo “césped” en tres secciones diferentes y en ángulos de 60° para conseguir una siembra uniforme de acuerdo con el método de Kirby Bauer (Expósito et al., 2019). Una vez sembradas las placas se dejaron en reposo hasta su aclimatación durante 5 minutos.

Con ayuda de pinzas estériles se colocaron 17 antibióticos a una distancia de 2.5 cm; por cada caja se colocó un máximo de 7 discos de antibióticos (Figura 6). Se sellaron cuidadosamente y se verificó el código de cada cepa aislada para evitar errores en los datos. Posteriormente, se dejó en incubación a 35° C durante 24 horas en posición invertida (Jafari

et al., 2021). Finalmente, se midió el diámetro de los halos de inhibición en milímetros, utilizando un calibrador o pie de rey (0-150mm Electronic Digital Caliper).

Figura 6. Elaboración de antibiogramas con 17 tipos de antibióticos



3.3.4 Prueba de sinergia de doble disco para la detección de la producción de BLEE.

Adicionalmente, para confirmar la producción de betalactamasas de espectro extendido BLEE, se realizó con cada cepa aislada una prueba de sinergia de doble disco, situando un disco con ácido clavulánico (20/10 μg), un inhibidor de betalactamasas, próximo a discos betalactámicos indicadores como cefotaxima CTX (30 μg) y ceftazidima CAZ (30 μg), a una distancia aproximada de 2,5 cm. De tal forma que nos permita ver el efecto sinérgico producido. Posteriormente, se incubó durante 24 horas a 35° C (García, 2010).

Las cepas que resultaron ser productoras de BLEE demostraron una ampliación del halo de inhibición de cefotaxima y ceftazidima en la zona próxima al disco con ácido clavulánico, evidenciando así la sinergia (Enríquez y Peralta, 2015).

3.3.5 Determinación del perfil de susceptibilidad en base a la guía del CLSI.

Teniendo en cuenta los resultados del perfil de susceptibilidad se realizó la interpretación de los perfiles en base a los halos de inhibición identificados fenotípicamente de acuerdo con el Clínic and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2023), como se detalla en la Tabla 3. De esta manera, se compararon los puntos de corte para determinar la sensibilidad o resistencia de cada antibiótico para cada aislado (Nocua et al., 2017).

Tabla 3.*Criterio de interpretación de la zona de inhibición según CLSI 2023.*

Zona de inhibición (mm)				
Antibióticos	Contenido	S	I	R
Amoxicilina	30 ug	>=18	14 – 17	<=13
Amikacina	30 ug	>=17	15 – 16	<=14
Azitromicina	15 ug	>=13	-	<=12
Cefepime	30 ug	>=25	19– 24	<=18
Cefotaxime	30 ug	>=26	20 – 25	<=19
Cefoxitin	30 ug	>=18	15 - 17	<=14
Ceftazidime	30 ug	>=21	-	<=20
Ciprofloxacina	5 ug	>=26	22 – 25	<=21
Ertapenem	10 ug	>=22	19– 21	<=18
Gentamicina	10 ug	>=15	13 - 14	<=12
Fosfomicina	200 ug	>=16	12 - 15	<=12
Tetraciclina	30 ug	>=15	12 - 14	<=11
Piperacilina/Tazobactam	110 ug	>=25	21 - 24	<=20
Tigeciclina	15ug	>=18	-	<=18
Levofloxacina	15ug	>=21	17 - 24	<=16
Nitrofurantoina	300 ug	>=17	15 - 16	<=14
Trimetoprim/sulfametoxazole	25 ug	>=16	11 - 15	<=10

3.4. Identificación de genes de resistencia (BLEE) a antibióticos.

Previamente se comprobó la integridad del ADN aislado mediante electroforesis. Se colocaron 2 µl de colorante de carga ADN 6X (Thermo Scientific™) en un parafilm y se homogenizó con 5 µl del ADN extraído. Se colocaron las muestras de ADN en pocillos en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 1x. Finalmente, se programó la fuente de potencia (Labnet®) a 110 V durante 30 min y se revelaron los resultados en el transiluminador. Este paso nos permitió garantizar la integridad del ADN para su posterior uso.

3.4.1 Amplificación de los genes de resistencia mediante PCR.

En los aislados productores de BLEE confirmados fenotípicamente, se evaluó la presencia de los genes *bla*_{CTX-M} (grupos 1, 2, 8, y 9) y los genes de carbapenemasas *bla*_{KPC} y *bla*_{NDM}, mediante PCR. Se utilizaron cebadores específicos para los diferentes genes y así determinar la presencia del gen (González et al., 2017), que se detalla a continuación en la tabla 4.

Tabla 4.

Secuencia de cebadores para la identificación de genes BLEE.

Genes BLEE	Forward (5' a 3') Reverse (5' a 3')	Temperatura de Anillamiento (C°)	pb
<i>bla</i> _{CTX-M}			
Grupo 1	F: CCCATGGTTAAAAAATCACTGC R: CAGCCGCCTTTTGCCGTCTAAG	58	800
Grupo 2	F: ATGATGACTCAGAGCATTTCG R: TGGGTTACGTTTTCGCCGC	58	900
Grupo 8	F: TGATGAGCATCGCGTTAAG R: TAACCGTCGGTGACGATTTT	59	900
Grupo 9	F: AAAAGGATCCTTGGGTTGCTCTCTGTGG R: AAAGGATCCCGATCAACAAAACCAG	55	1100
<i>bla</i> _{KPC}	F: TGTCACTGTAGTCGCCGTC R: CTCAGTGCTCTACGAAAACC	60	1500
<i>bla</i> _{NDM}	F: GCATTAGCCGCTGCATTGAT R: GGAATGGCTCATCACGATCA	58	700

Para estandarizar la temperatura de anillamiento y concentración de magnesio se utilizaron como controles positivos cepas caracterizadas del Laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Universidad Técnica del Norte. Se empleó un volumen de reacción final de 25 µl para cada cepa portadora del gen. Posteriormente, se realizó el proceso de electroforesis, con las condiciones detalladas anteriormente.

Una vez estandarizado el proceso de amplificación, se preparó la solución madre (1X) con un volumen final de 25 µl; utilizando 12.5 µl de la polimerasa comercial Mix GoTaq® Green Master Mix (2x), 0.4 mM de los primers específicos y 3mM de magnesio (Promega®) a excepción del gen *bla*_{NDM} que no fue necesario añadir magnesio.

Además, se añadió 5 µl del ADN bacteriano de cada aislado y control, y de agua libre de nucleasas (Promega®), como control negativo. Se programó el ciclo de PCR utilizando un termociclador (SimpliAmp®), iniciando con una desnaturalización inicial de 94 °C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos en el paso de desnaturalización de 94 °C por 1 minuto y temperatura de anillamiento dependiendo del gen utilizado (Tabla 4) por 30 segundos. Finalmente, un paso de elongación a 72 °C durante 1 minuto, seguido de extensión final a 72°C durante 7 minutos e incubación a 4 °C.

3.4.2 Electroforesis.

Los productos de amplificación fueron resueltos en geles de agarosa al 1% en tampón TBE 1x, de acuerdo con la metodología mencionada previamente. Los geles fueron analizados en un transiluminador (Cleaver Scientific®) y fotodocumentados. La corrida electroforética fue llevada a cabo a 110 V por 43 minutos. Finalmente, se verificó el tamaño del ADN amplificado usando un marcador de peso molecular de 1kb.

3.4.3 Secuenciación y análisis de secuencias para determinar las variantes de los genes de resistencia.

Los productos de amplificación para cada gen fueron examinados mediante secuenciación tipo Sanger en los Laboratorios Macrogen, Inc. (Seúl, Corea del Sur). Las secuencias fueron analizadas con el programa Mega 7 y comparados con la base de datos GenBank, obteniendo la información de las variantes alélicas de los genes identificados en las cepas de *E. coli* BLEE, tras realizar una comparación genómica (Sapkota et al., 2019).

3.5 Análisis estadístico.

Los resultados se organizaron en una base de datos con la información: lugar, fecha de muestreo, conteo de colonias, identificación del microorganismo, el perfil de susceptibilidad antimicrobiana, la detección fenotípica de BLEE, así como la caracterización mediante biología molecular.

Los datos obtenidos de la investigación fueron analizados mediante el programa InfoStat/L considerando las variables de estudio: el punto de muestreo y UFC para el primer objetivo. Para ello se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, con un nivel de

confianza de 95% ($\alpha = 0.05$) (Perozo, 2009). Para la determinación del perfil de susceptibilidad, se registraron los datos elaborando mapas de calor, considerando si es sensible, intermedio o resistente para cada uno de los antibióticos, en cada aislado. Además, se analizó el porcentaje de resistencia de cada aislado a los 17 antibióticos utilizando tablas de contingencia, esto con el fin de facilitar la interpretación de los resultados obtenidos en la investigación y evaluar los niveles de resistencia en los aislados.

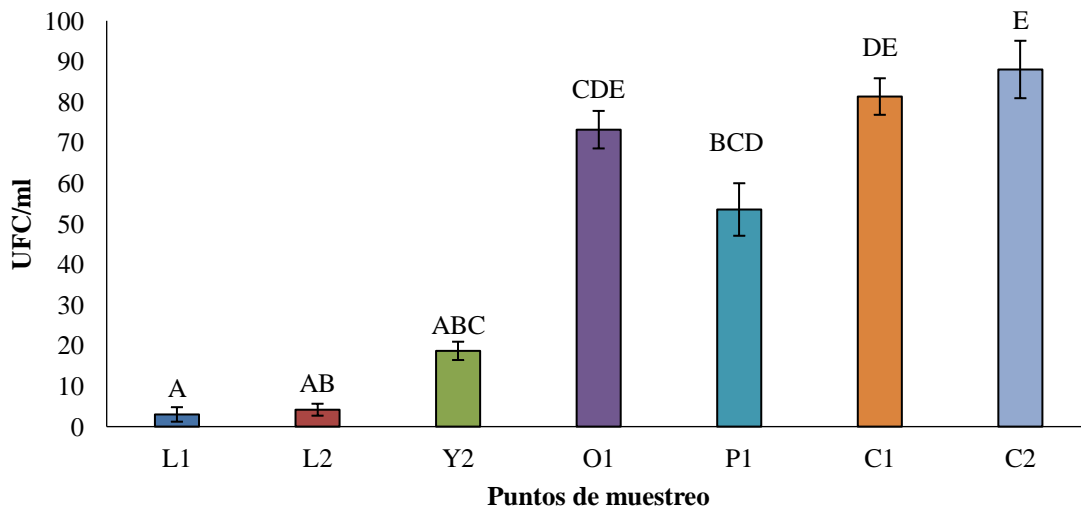
CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación de recuentos bacterianos.

La prueba de Kruskal Wallis determinó que existen diferencias significativas entre los puntos de muestreo para el número UFC contabilizadas en las muestras de agua ($H= 38.63$, $gl= 6$, $p<0.001$). De acuerdo con la Figura 7 existe mayor presencia de *E. coli* resistente en los puntos de muestreo Odilas (O1), Cananvalle 1 (C1) y Cananvalle 2 (C2), siendo este último punto el que presentó mayor recuento bacteriano (88 UFC/ml). Por otro lado, en Laurel 1 (L1) se obtuvo el menor número de bacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación (3 UFC/ml), mientras que en Yuyucocha 1 (Y1) no se determinó presencia de bacterias resistentes.

Figura 7. Recuento de UFC (UFC/ml) en 8 puntos del canal de riego en muestras de agua. Diferentes letras en la parte superior indican diferencias significativas entre la carga bacteriana de los diferentes puntos de muestreo. Puntos de muestreo: Laurel 1 (L1), Laurel 2 (L2), Yuyucocha 2 (Y2), Odilas (O1), Pugacho (P1), Cananvalle 1 (C1) y Cananvalle 2 (C2). Las barras de error representan el valor de la desviación estándar (SD).



De acuerdo con la Ley Orgánica del Régimen de la Soberanía Alimentaria (2009), el artículo 5 menciona que “El Acceso y uso del agua como factor de productividad se regirá por lo dispuesto en la Ley que trate los recursos hídricos, su uso y aprovechamiento, y en los

respectivos reglamentos y normas técnicas”, de tal manera, se establece que el uso del agua de riego se registrará bajo la ley y normas constitucionales del Ecuador. Considerando la normativa ecuatoriana sobre la calidad del agua destinada al uso agrícola (Acuerdo Ministerial 097-A), los criterios admisibles para el recuento de coliformes totales son NMP/100ml o 0 UFC/100 y un máximo de 1000 (MAAE, 2015). Además, se detalla que la presencia de *E. coli* en aguas de riego debe ser un valor paramétrico < 1000 UFC/100 ml (Registro oficial N°387, 2015). En este caso, se obtuvo 88 UFC/ml de *E. coli* resistente considerando que aún se encuentra bajo el rango establecido como límite máximo permisible para el uso en riego agrícola.

Los canales destinados al uso agrícola, al encontrarse al aire libre, pueden tener diversas fuentes de contaminación tales como: introducción de agua residual, desechos domésticos de sectores urbanos, cercanía con animales de producción, incluso el uso de estiércol como fertilizante (Amato et al., 2021). Los resultados de esta investigación confirman que el agua de riego puede contribuir a la propagación de patógenos a lo largo del canal, especialmente donde la actividad humana es mayor (Vital et al., 2018b). En este caso, se evidenció que Odilas y Pugacho (centro de la ciudad) fueron los sectores donde ingresaban la mayor cantidad de contaminantes (fecales, efluentes líquidos, eliminación inadecuada de medicamentos) al canal de riego, en comparación al sector de Laurel donde no existe urbanización. De esta manera, estas zonas favorecerán la proliferación de *E. coli* resistente y posteriormente llegando a la zona agrícola de Cananvalle.

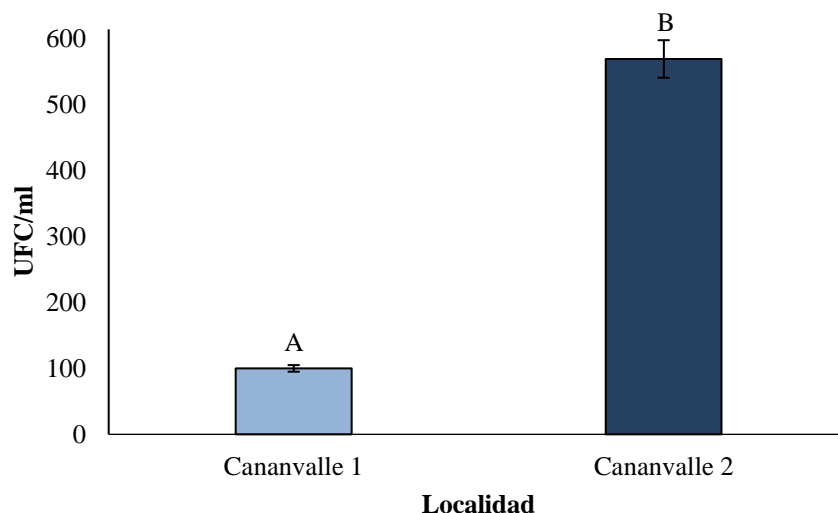
Por otro lado, se ha demostrado que *E. coli* puede sobrevivir en corrientes de agua durante períodos relativamente prolongados, lo que puede tener graves consecuencias para la salud humana (Peña y Silva, 2019). En América Latina, el 90% de las bacterias presentes en ambientes acuáticos han demostrado ser resistentes a varios antibióticos, lo que afecta directamente al ecosistema (Leonor et al., 2015).

En un estudio similar, Araújo et al., (2017) determinó la prevalencia de *E. coli* en el 50% de las muestras de agua de riego y 38% en muestras vegetales. En el presente estudio se obtuvo el 78% de *E. coli* resistente en muestras de agua del canal de riego Cananvalle, y 11% en muestras de vegetales.

A nivel nacional existen pocos estudios sobre *E. coli* aislada del agua de riego. En la investigación de Montero et al., (2021), confirmaron la presencia de esta especie con el 29% de los canales de riego analizados en las 17 provincias del Ecuador y un 11% en vegetales del total de muestras analizadas, siendo evidencia suficiente de la presencia de resistencia a los antimicrobianos en el Ecuador en estos ambientes.

Como se muestra en la Figura 8, se encontraron diferencias significativas ($F=23.94$, $gl=18$, $p<0.001$), en la carga de unidades formadoras de colonias resistentes entre las dos localidades (Cananvalle 1 y Cananvalle 2), siendo Cananvalle 2 el que presentó mayor cantidad bacteriana resistente (569 UFC/ml).

Figura 8. . Recuento de UFC/ml en Cananvalle 1 y Cananvalle 2 del canal de riego. Diferentes letras en la parte superior indican diferencias significativas. Las barras de error representan el valor de la desviación estándar (SD).



Cabe señalar que, en las dos localidades del sector Cananvalle se utiliza una técnica de riego por surcos, de acuerdo con la socialización previa a los agricultores de la zona. En el trabajo de Van Der Linden et al., (2013) encontraron que el riego por aspersión estaba asociado con una mayor contaminación en la lechuga por patógenos entéricos. De tal manera, se considera que la técnica de riego por surcos es menos perjudicial para la transmisión de bacterias resistentes, en comparación al riego por aspersión. Además, las estaciones son otro factor ambiental que incide en la prevalencia de *E. coli* en vegetales, especialmente durante

la época de lluvia o invierno (Peña y Silva, 2019). Se destaca que las muestras obtenidas para este estudio fueron recolectadas en temporada lluviosa.

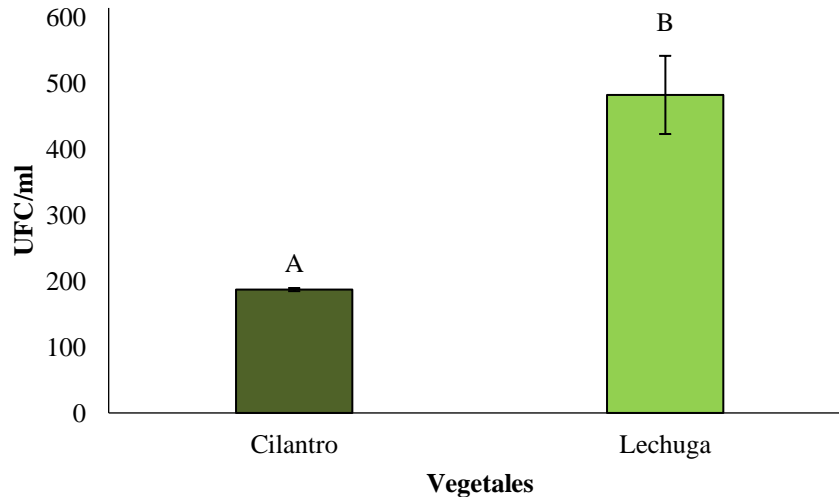
La Figura 9 indica que existen diferencias significativas ($F=5.25$, $gl=16$, $p<0.001$) entre los dos tipos de vegetales, obteniendo una mayor carga bacteriana resistente de *E. coli* (482 UFC ml⁻¹) en las muestras de lechuga. De acuerdo con el análisis bibliográfico, las hortalizas de hoja son más susceptibles a la acumulación de bacterias resistentes (Salmanov et al., 2021), dependiendo del tipo de antibiótico, suelo, técnica de riego y especie vegetal (Inyinbor et al., 2021).

Tanto la lechuga como el cilantro son considerados los principales vegetales más contaminados por microorganismos resistentes y a la vez, son los más consumidos sin proceso previo de cocción por la población (Betancourt., 2018).

Por lo general, *E. coli* puede ingresar a la porción comestible de la planta a través del sistema radicular y convertirse en un portador potencial de patógenos comensales (Hölzel et al., 2018). Además de adquirir nutrientes, algunas cepas de *E. coli* utilizan estructuras filamentosas como fimbrias y pili para adherirse al interior de las plantas, (ya sea a través de las raíces o salpicaduras de lluvia o riego hacia las hojas) (Van Elsas et al., 2011). Por ejemplo, se ha comprobado que la *E. coli* que se encuentra en la lechuga no se puede lavar o eliminar fácilmente mediante desinfectantes, especialmente en los compartimientos internos de las hojas (Robles, 2017). Y en este caso, al ser un vegetal que se consume mayoritariamente cruda, puede ser ingerido fácilmente con bacterias resistentes, colonizando el tracto digestivo (Croxen et al., 2013).

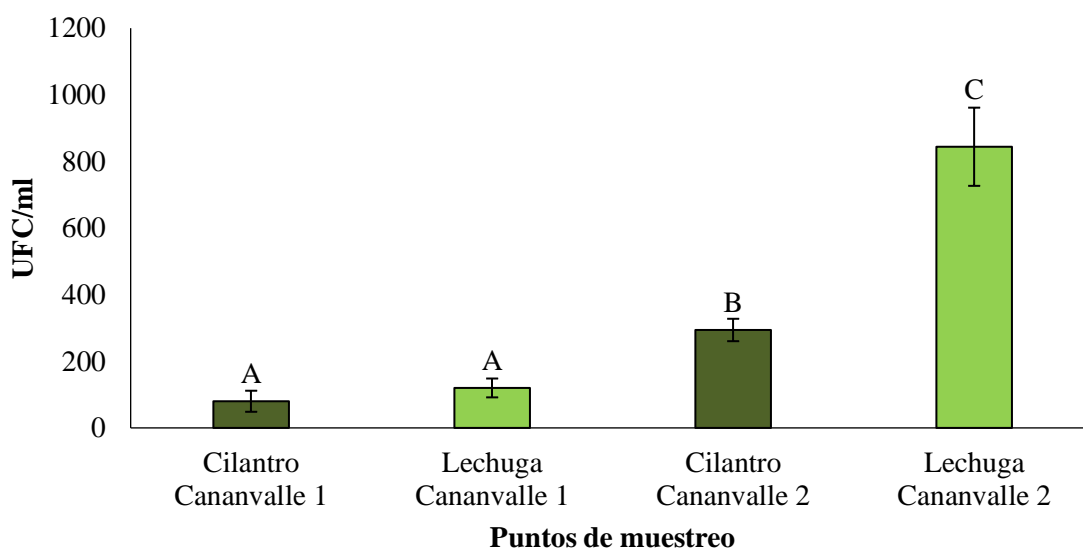
Con respecto al cilantro, otra investigación realizada en la ciudad de Ibarra presentó un mayor índice de contaminación por *E. coli* en mercados urbanos (Plasencia, 2020) en comparación al presente estudio, probablemente ocasionado por la contaminación postcosecha de este vegetal.

Figura 9. Recuento de UFC/ml en dos tipos de vegetales del canal de riego Cananvalle- Ibarra. Diferentes letras indican diferencias significativas. Las barras de error representan el valor de la desviación estándar (SD).



Se encontraron diferencias significativas ($F=33.29$, $gl=16$, $p<0.001$) en el número de unidades formadoras de colonia de *E. coli* considerando los dos vegetales estudiados (cilantro, lechuga) con respecto a los puntos de muestreo (Cananvalle 1, Cananvalle 2), como lo indica la Figura 10. Se observó una similitud para los dos tipos de vegetales en el punto Cananvalle 1 evidenciada mediante el rango de significancia (A). Sin embargo, la presencia de colonias resistentes en los cultivos de Cananvalle 2 fue mayor en aislados de lechuga (C), en comparación a aislados de cilantro con una menor proporción (B). Cabe señalar que en Pugacho (P1) no se detectaron colonias resistentes de *E. coli* en muestras vegetales. En este caso, considerando otros factores como el contacto directo de las hojas con el aire, suelo y agua, la irrigación con aguas no tratadas, sustitución de fertilizantes químicos por estiércol, heces de los animales, técnicas de cosecha, condiciones de transporte y la temperatura de almacenamiento (Rincón et al., 2010).

Figura 10. Recuento de UFC/ml en las muestras vegetales en 2 puntos del canal de riego. Diferentes letras indican diferencias significativas. Las barras de error representan la desviación estándar (SD).



De la misma manera, otros estándares internacionales, como la OMS y la USEPA, relacionados a canales de agua de riego, establecen medidas hasta 1000 NMP/100ml coliformes fecales (León, 2016) y 100UFC/100ml para *E. coli* como bacteria indicadora de contaminación fecal, de acuerdo con la guía de Buenas Prácticas Agrícolas publicada por la Comisión Europea y Asociación Española (ISO 16075:2015). Sin embargo, otros estudios sugieren permitir un máximo de 100 UFC/100ml de *E. coli* en vegetales y un máximo de 10 UFC/100ml de *E. coli* en agua de riego para evitar su propagación en la comunidad (Arrebola, 2019).

Es importante mencionar que en las muestras de suelo se obtuvo un total de 135 UFC/ml de *E. coli* resistente. Esto sugiere la diseminación de la resistencia a los antimicrobianos en la cadena alimenticia desde los suelos agrícolas hacia los vegetales cosechados, y en última instancia, a los consumidores (Cerqueira et al., 2019). En un estudio realizado por Jokinen et al., (2019), se mostró una concentración de 100 UFC/ml para *E. coli* en suelo agrícola, lo que se relaciona con la alta humedad del suelo provocada por la lluvia o el riego.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la carga bacteriana en el suelo agrícola fue mayor que en el canal de riego y en las muestras vegetales, al igual que resultados obtenidos en otros estudios (Fonseca et al., 2011; Muniesa et al., 2018). Es probable que los niveles

significativamente altos de *E. coli* resistente en el suelo agrícola, se deba a la adición de estiércol no tratado o abono orgánico (con residuos antimicrobianos) al cultivo como fertilizante, favoreciendo la formación de un reservorio de este tipo de bacterias (Udikovic-Kolic et al., 2014). Además, factores del suelo como la porosidad o la capa superficial juegan un papel importante en la proliferación de bacterias invasoras por su influencia en la adsorción y el movimiento gravitacional con el agua (Van Elsas et al., 2011)

4.2 Identificación de la especie bacteriana.

Se obtuvo un total de 174 aislados bacterianos, de las cuales 136 pertenecen a muestras de agua (78.2%), 20 a muestras vegetales (11.5%) y 18 a muestras de suelo (10.3%). Mediante la técnica de tinción de Gram se verificó la morfología típica de *E. coli*, cocobacilos gram negativos (Gonzalez, 2013).

4.2.1 Pruebas bioquímicas para la identificación de E. coli.

Como se detalla en la Tabla 5, el 100% de las cepas aisladas en los puntos de muestreo Laurel 1, Laurel 2, Yuyucocha 2, Pugacho y Cananvalle 1 presentaron resultados positivos para las pruebas bioquímicas características de *E. coli*, mientras que en los otros puntos del canal de riego se observaron resultados incongruentes. Es importante señalar que en una investigación previa realizada por Sosa, (2003), se sugiere que estas discrepancias pueden deberse a que muchas de las cepas de *E. coli* son mutantes auxotróficos; además de que puede existir presencia de contaminación o en algunos casos de una posible aparición de revertantes de los marcadores genéticos.

Tabla 5.

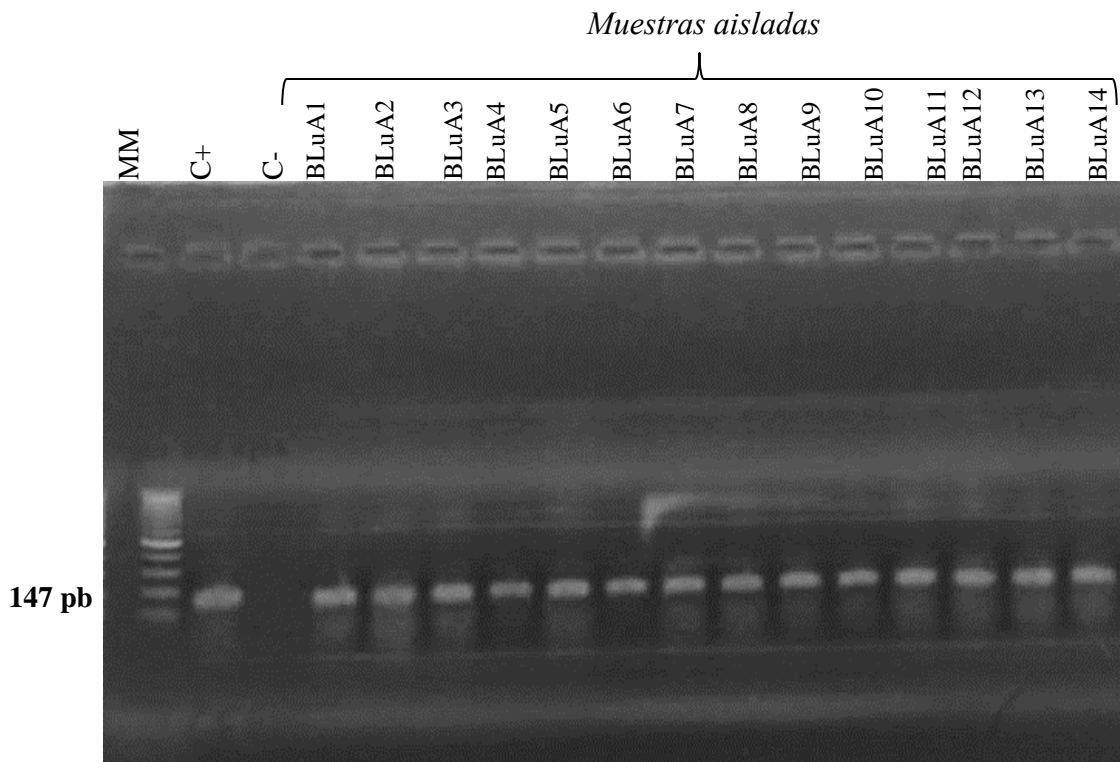
Porcentaje de cepas con características fisiológicas positivas para *E. coli* por tipo de muestra y punto de muestreo. TSI= Hierro triple azúcar, SIM= Sulfuro Indol Movilidad, Simmons Citrato.

Muestra	Localidad	Número de aislados	Pruebas bioquímicas positivas para <i>E. coli</i> TSI, SIM, Simmons Citrato (%)
Agua	Laurel 1	14	100.0
	Laurel 2	14	100.0
	Yuyucocha 1	6	94.4
	Yuyucocha 2	12	100.0
	Odilas	36	97.2
	Pugacho	18	100.0
	Cananvalle 1	18	92.6
	Cananvalle 2	18	94.4
Vegetales	Cananvalle 1	8	100.0
	Cananvalle 2	12	86.1
Suelo	Cananvalle 1	18	98.1

4.2.2 Prueba molecular para la identificación de *E. coli*.

En la Figura 11 se puede observar que el 100% de las 174 cepas analizadas presentaron bandas de ADN con un tamaño de 147 pb, correspondientes al fragmento amplificado del gen *uidA*, con los primers especificados previamente, confirmando así la especie en estudio. Varios estudios han utilizado favorablemente este gen como marcador molecular para la identificación y confirmación molecular de la especie *Escherichia coli* (Arul et al., 2008; Kibbee et al., 2013; Molina et al., 2015; Muniesa et al., 2018).

Figura 11. Amplificación del gen *uidA* de la especie bacteriana *E. coli*.



4.3 Identificación de perfiles de susceptibilidad en los aislados obtenidos.

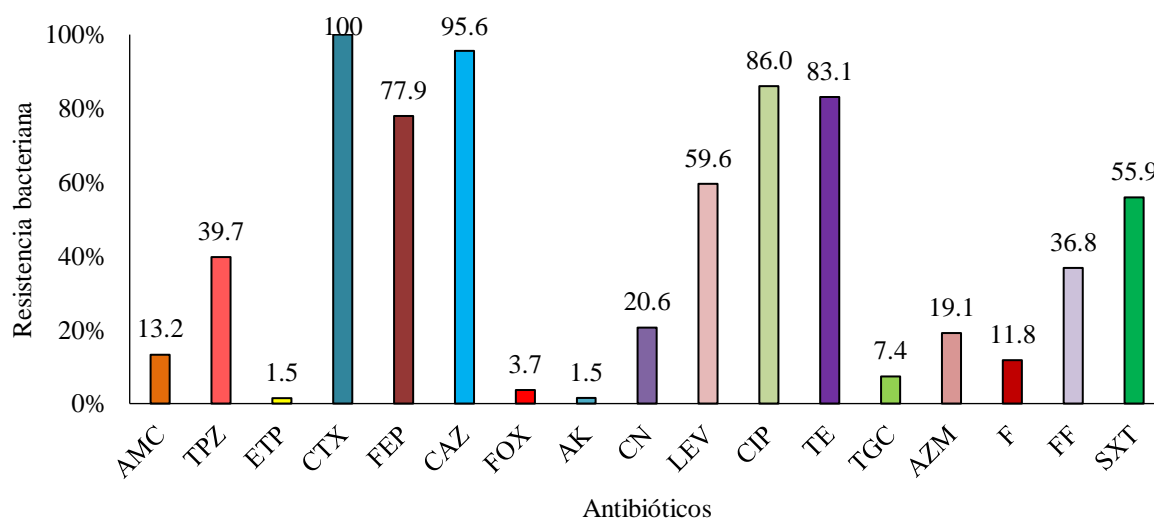
4.3.1 Perfiles de susceptibilidad en muestras de agua

En el Anexo 7 se presenta la tendencia de resistencia en los aislados de muestras de agua, el color verde representa un perfil susceptible (45.2%) el amarillo un perfil intermedio (12.8%) y el rojo un perfil resistente (42.0%) en los antibióticos probados.

Como se detalla en la Figura 12, los aislados del agua de riego presentaron porcentajes elevados de resistencia a CAZ, FEP y TE de 95.6, 77.9 y 83.1%, respectivamente, siendo valores altos. El 100% de los aislados presentaron resistencia a CTX. (Astocondor, 2018). Estos resultados coinciden con Montero et al., (2021), quienes identificaron aislados de *E. coli* altamente resistentes a cefotaxima (96%), tetraciclina (79%) y cefepime (84%), en aislados procedentes de agua de riego en Ecuador.

Los perfiles de resistencia en este estudio reflejan una advertencia de salud pública, especialmente cuando bacterias como *E. coli* presentan cepas resistentes a antibióticos en el ambiente. En otro estudio sobre aguas afluentes se obtuvieron con la misma especie, porcentajes de resistencia a cefotaxima del (100%), ceftazidima (99%), ciprofloxacina (93%), y tetraciclinas (82%) (Oliveira et al., 2023). En este caso, se presentan resistencias elevadas a ciprofloxacina y levofloxacina, asociadas al aumento de enterobacterias productoras de BLEE y al uso inapropiado de estos antibióticos, en el tratamiento empírico de infecciones por *E. coli* y, en general, infecciones urinarias a nivel comunitario (Aragón, 2011).

Figura 12. Perfil de resistencia en muestra de agua para 17 antibióticos. La nomenclatura especifica los diferentes antibióticos empleados: **AMC:** Amoxicilina/ácido clavulánico, **TPZ:** Piperacilina/tazobactam, **ETP:** Ertapenem, **CTX:** Cefotaxima, **FEP:** Cefepime, **CAZ:** Ceftazidima, **FOX:** Cefotixitina, **AK:** Amikacina, **CN:** Gentamicina, **LEV:** Levofloxacina, **CIP:** Ciprofloxacina, **TE:** Tetraciclina, **TGC:** Tigeciclina, **AZM:** Azitromicina, **F:** Nitrofurantoina, **FF:** Fosfomicina, **SXT:** Trimetoprima sulfametoxazol. *n*=136 aislados de *E. coli*.



Por el contrario, solo el 1.5% de los aislados demostraron resistencia para ETP y AK, siendo valores bajos en las muestras de agua (Tabla 6). De acuerdo a bibliografía, las BLEE tienen capacidad de hidrolizar y causar resistencia a penicilinas, oximino-cefalosporinas, pero no a cefamicinas como cefoxitina, ni a carbapenémicos como imipenem, meropenem y ertapenem, siendo inhibidas por el ácido clavulánico (Navarro et al., 2011), lo que concuerda

con el bajo nivel de resistencia en el presente estudio. Por otro lado, la amikacina muestra actividad variable frente a las enterobacterias productoras de BLEE en *E. coli*, siendo el antibiótico que demuestra una menor tasa de resistencias (García et al., 2011).

En el caso de la fosfomicina se obtuvo un 11.8% de resistencia, sin embargo, a nivel clínico se asocia a la investigación llevada a cabo por Lifonzo et al., (2015) en donde se evaluaron cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de urocultivos, observando una resistencia a fosfomicina del 27.8%, siendo una alternativa terapéutica frente a cepas resistentes.

Tabla 6

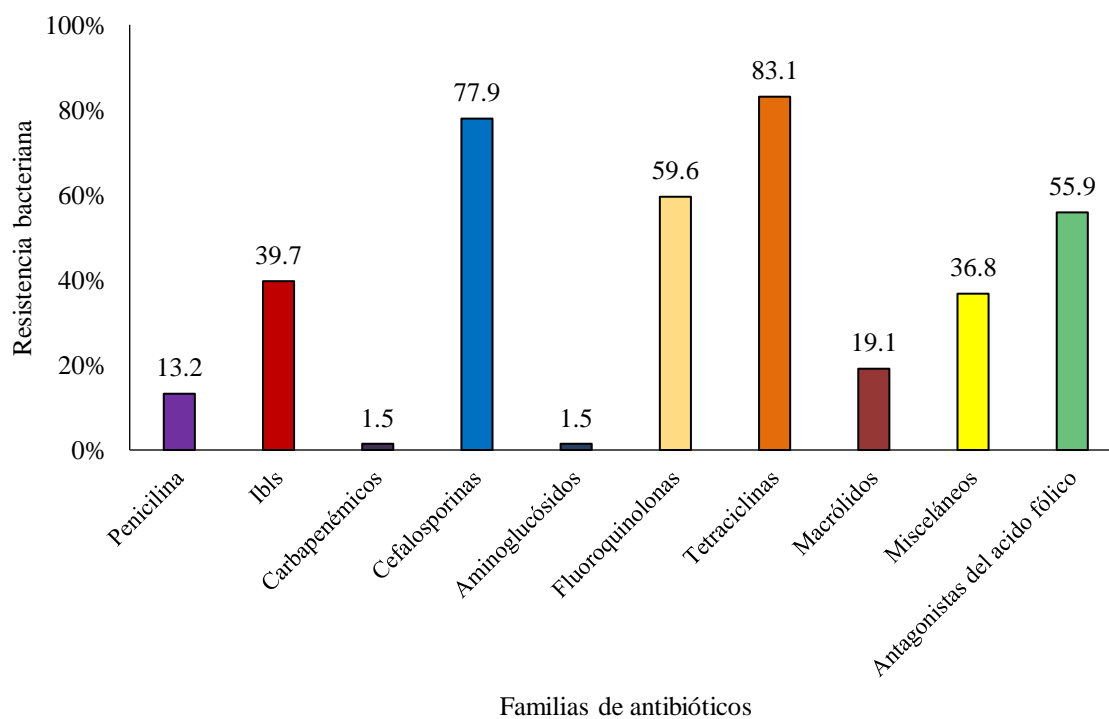
Perfil de susceptibilidad en muestras de agua para 17 antibióticos. La nomenclatura especifica los diferentes antibióticos empleados: AMC: Amoxicilina/ácido clavulánico, TPZ: Piperacilina/tazobactam, ETP: Ertapenem, CTX: cefotaxima, FEP: Cefepime, CAZ: Ceftazidima, FOX: Cefotixitina, AK: Amikacina, CN: Gentamicina, LEV: Levofloxacin, CIP: Ciprofloxacina, TE: Tetraciclina, TGC: Tigeciclina, AZM: Azitromicina, F: Nitrofurantoina, FF: Fosfomicina, SXT: Trimetoprima sulfametoxazol.

Antibióticos	Intermedio (%)	Resistente (%)	Sensible (%)
AMC	55.9	13.2	30.9
TPZ	57.4	39.7	2.9
ETP	6.6	1.5	91.9
CTX	0.0	100.0	0.0
FEP	21.3	77.9	0.7
CAZ	0	95.6	4.4
FOX	6.6	3.7	89.7
AK	10.3	1.5	88.2
CN	0.0	20.6	79.4
LEV	27.2	59.6	13.2
CIP	11.0	86.0	2.9
TE	1.5	83.1	15.4
TGC	0.0	7.4	92.7
AZM	0.0	19.1	80.9
F	16.9	11.8	71.3
FF	0.7	36.8	62.5
SXT	2.2	55.9	41.9

En el trabajo realizado por Roland, (2000) se examinó la actividad *in vitro* de antibióticos de amplio espectro frente a aislados de *E. coli* BLEE, demostrando que piperacilina-tazobactam fue el segundo antibiótico con una mayor actividad de inhibición mostrando el 84.4%, lo que representa una contribución importante al tratamiento de las infecciones nosocomiales en los aislados clínicos de un hospital en Sao Paulo, Brasil; este dato contrasta con lo observado en este estudio, que señaló un 39.2% de resistencia.

Las cepas de *E. coli* aisladas en muestras de agua demostraron resistencia a los antibióticos pertenecientes a las familias: tetraciclinas con un 83.1%, seguidos por la familia de cefalosporinas con 77.9% y fluoroquinolonas con 59.6% (Figura 13). Estos resultados coinciden con el estudio realizado por Gekenidis et al., (2018), que descubrieron *E. coli* resistente a ceftazidima y cefotaxima del 80% (tercera generación), al examinar el agua de riego de las principales áreas de cultivo de hortalizas en Suiza. Para el resto de los antibióticos el perfil de resistencia no superó el 39.7% como se observa en la Figura 13.

Figura 13. Perfil de susceptibilidad en aislados de *Escherichia coli* de muestra de agua, por familias de antibióticos.



Tanto las cefalosporinas de tercera generación y las tetraciclinas son los antibióticos más utilizados en los últimos años (Odonkor y Addo, 2018), sin embargo, fueron los que mayor resistencia presentaron en las muestras del canal de riego Cananvalle. Algunos investigadores interpretan esta situación como consecuencia de un uso indiscriminado de fármacos, por lo que resultan ineficaces en más de la mitad de los pacientes. Las bacterias como *E. coli* ahora producen enzimas modificadas que pueden degradar estos antibióticos de uso común y ser precursoras de la resistencia clínica y veterinaria. Además, se ha demostrado que varias cepas de *E. coli* pueden transportar el mismo plásmido transmisible resistente a múltiples fármacos a lo largo de la cadena de agua de riego desde un depósito abierto (Gekenidis et al., 2018b).

En otro estudio, Barroso et al., (2021) demostraron que los aislados de *E. coli* BLEE provenientes de ambientes dulceacuícolas de la Habana, presentan resistencia a cefalosporinas de tercera generación con un 100%, así como corresistencia a las familias de las tetraciclinas y quinolonas (71.4%), dando una repercusión clínica y ambiental. De manera similar, Vidoni et al., (2020) menciona que, al evaluar la resistencia bacteriana en urocultivos se obtuvo una tasa de prevalencia de resistencia a fluoroquinolonas que superaron el 20%, esto puede deberse al uso indiscriminado de dichos antibióticos para tratamientos empíricos iniciales.

Asimismo, la investigación de Mejía et al., (2017) demuestra que las *E. coli* aisladas de mastitis bovina en Michoacán, México han desarrollado resistencia a los antibióticos comúnmente usados en medicina veterinaria siendo un grupo de antibióticos empleados para el tratamiento de infecciones en ganado o se utilizan como promotores de crecimiento animal. Sin embargo, en dicho estudio, se observaron bajos índices de resistencia para fluoroquinolonas como levofloxacina (8.8 %).

4.3.2 Perfiles de susceptibilidad en aislados de E. coli en muestras vegetales.

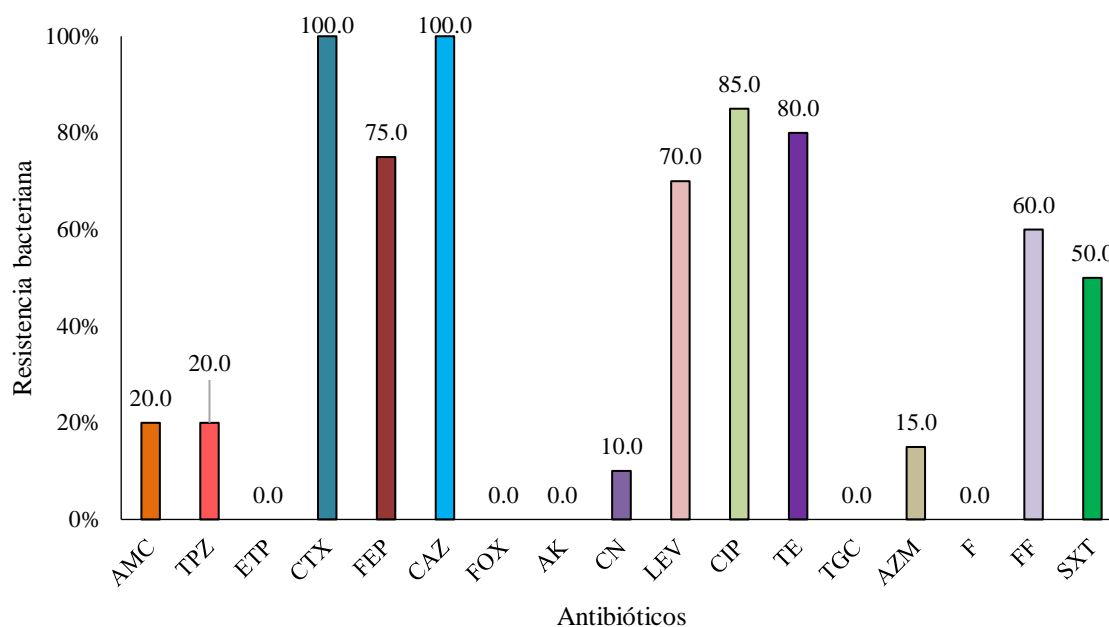
Mediante el mapa de calor generado a partir del perfil de susceptibilidad en aislados bacterianos aislados de vegetales se observó sensibilidad en el (48.8%), un perfil intermedio de (10.9%) y resistencia de (40.3%). Conjuntamente, se demostró que los aislados a partir de vegetales presentaron valores de inhibición mayores en comparación a las muestras de agua, como se detalla en el Anexo 8.

Como se observa en la Figura 14, el 100.0% de los aislados fueron resistentes para CTX y CAZ. Por otra parte, se evidencia una resistencia del 75.0% para FEP, considerando que pertenece a cefalosporinas de cuarta generación. A pesar de que los β -lactámicos forman parte de los antibióticos más usados correspondiendo al 50.0% de todas las recetas médicas en el mundo (Quiñones, 2017). En un contraste con nuestro estudio, Salmanov et al., (2021) demostró que los aislados de hortalizas frescas presentaron sensibilidad para cefotaxima (99.1%), ceftazidima (99.4%).

Tras realizar las pruebas de susceptibilidad, se identificó que AMC, TE y TPZ, presentaron una resistencia del 20.0, 80.0 y 20.0%, respectivamente. La investigación llevada a cabo por Ratshilingano et al., (2022) que relaciona a *E. coli* aislada de vegetales de hojas verdes y el agua de riego empleada durante la producción y el procesamiento de dichos vegetales, señaló resistencia a amoxicilina (68.6%), tetraciclina (45.0%), trimetoprim-sulfametoxazol (43.0%).

En este estudio se obtuvo en los aislados una resistencia del 10.0% para gentamicina. De igual manera, un estudio mostró susceptibilidad a la gentamicina en productos frescos (col, espinaca y lechuga) influenciados por el canal de riego para la producción agrícola proporcionando una perspectiva más favorable para el mantenimiento de la calidad del agua de riego y a su vez dando una visión sobre la influencia en los productos agrícolas. (Jongman y Korsten, 2016). Estudios similares concuerdan que, debido a los altos niveles de resistencia en diferentes hortalizas, son vehículos importantes para la transmisión de la resistencia antimicrobiana (Moon et al., 2022)

Figura 14. Perfil de susceptibilidad de los aislados de muestras vegetales ante 17 antibióticos. La nomenclatura específica los diferentes antibióticos empleados: **AMC:** Amoxicilina/ácido clavulánico, **TPZ:** Piperacilina/tazobactam, **ETP:** Ertapenem, **CTX:** cefotaxima, **FEP:** Cefepime, **CAZ:** Ceftazidima, **FOX:** Cefotixitina, **AK:** Amikacina, **CN:** Gentamicina, **LEV:** Levofloxacina, **CIP:** Ciprofloxacina, **TE:** Tetraciclina, **TGC:** Tigeciclina, **AZM:** Azitromicina, **F:** Nitrofurantoina, **FF:** Fosfomicina, **SXT:** Trimetoprima sulfametoxazol. n=20 aislados de *E. coli*.



Como se detalla en la Tabla 7, existe resistencia a cefalosporinas de tercera generación en un 100%. Los resultados obtenidos están acorde al estudio realizado por Salmanov et al., (2021), quién demostró una resistencia a cefalosporinas de tercera generación de 14.2% en los aislamientos de *E. coli* procedentes de muestras de vegetales frescos de seis grupos de productos de hortalizas frescas (hortalizas de hoja, hierbas de hoja, cebollas verdes, pepinos, bayas y tomates) en Ucrania. Por otro lado, la investigación de Chanseyha et al., (2018) evaluó *E. coli* en lechuga de hoja recolectadas de cultivos abiertos y supermercados en Tailandia teniendo como resultado que *Escherichia coli* fue más resistente a tetraciclina (70.4%).

Tabla 1

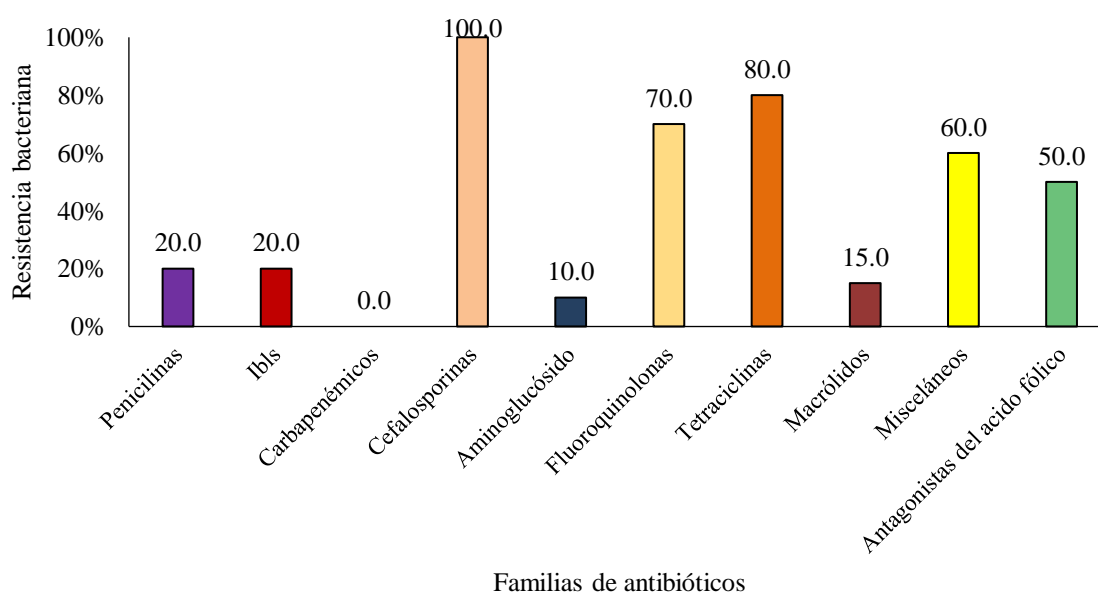
Perfil de susceptibilidad en los aislados de muestras vegetales ante 17 antibióticos. Las nomenclaturas especifican los diferentes antibióticos empleados: **AMC:** Amoxicilina/ácido clavulánico, **TPZ:** Piperacilina/tazobactam, **ETP:** Ertapenem, **CTX:** cefotaxima, **FEP:** Cefepime, **CAZ:** Ceftazidima, **FOX:** Cefotixitina, **AK:** Amikacina, **CN:** Gentamicina, **LEV:** Levofloxacin, **CIP:** Ciprofloxacina, **TE:** Tetraciclina, **TGC:** Tigeciclina, **AZM:** Azitromicina, **F:** Nitrofurantoina, **FF:** Fosfomicina, **SXT:** Trimetoprima sulfametoxazol.

Antibióticos	Intermedio (%)	Resistente (%)	Sensible (%)
AMC	55.0	20.0	25.0
TPZ	65.0	20.0	15.0
ETP	0.0	0.0	100.0
CTX	0.0	100.0	0.0
FEP	25.0	75.0	0.0
CAZ	0.0	100.0	0.0
FOX	0.0	0.0	100.0
AK	5.0	0.0	95.0
CN	0.0	10.0	90.0
LEV	10.0	70.0	20.0
CIP	10.0	85.0	5.0
TE	0.0	80.0	20.0
TGC	0.0	0.0	100.0
AZM	0.0	15.0	85.0
F	15.0	0.0	85.0
FF	0.0	60.0	40.0
SXT	0.0	50.0	50.0

Cabe destacar que las cepas aisladas de muestras vegetales presentaron resistencia elevada del 80.0% para la familia de tetraciclinas, seguida de fluoroquinolonas en 70.0% y de misceláneos del 60.0% como lo señala la Figura 15. Las tasas de resistencia a los antibióticos en *E. coli* están aumentando con rapidez, especialmente en la comunidad por la ingesta de alimentos contaminados (Collignon, 2009). Los daños y las aberturas de la planta pueden proporcionar áreas de protección para las bacterias y esto puede reducir la eficiencia de los procesos de limpieza del producto agrícola, así como favorecer el crecimiento bacteriano (O'Flaherty et al., 2019).

La resistencia a fluoroquinolonas se atribuye a los efectos debidos a la mutación que afectan los sitios blanco (ADN girasa y topoisomerasa) del medicamento, de igual manera el mecanismo más común de resistencia a macrólidos por bacterias Gram negativas, involucra la modificación del sitio blanco en el ribosoma (Cabrera et al., 2007). En un estudio sobre contaminación bacteriana en vegetales encontraron que *E. coli* no presentaba resistencia para las familias de los carbapenémicos y 1.3% para misceláneos como fosfomicina (Salmanov et al., 2021).

Figura 15. Perfil de susceptibilidad en aislados de muestras vegetales por familias de antibióticos.



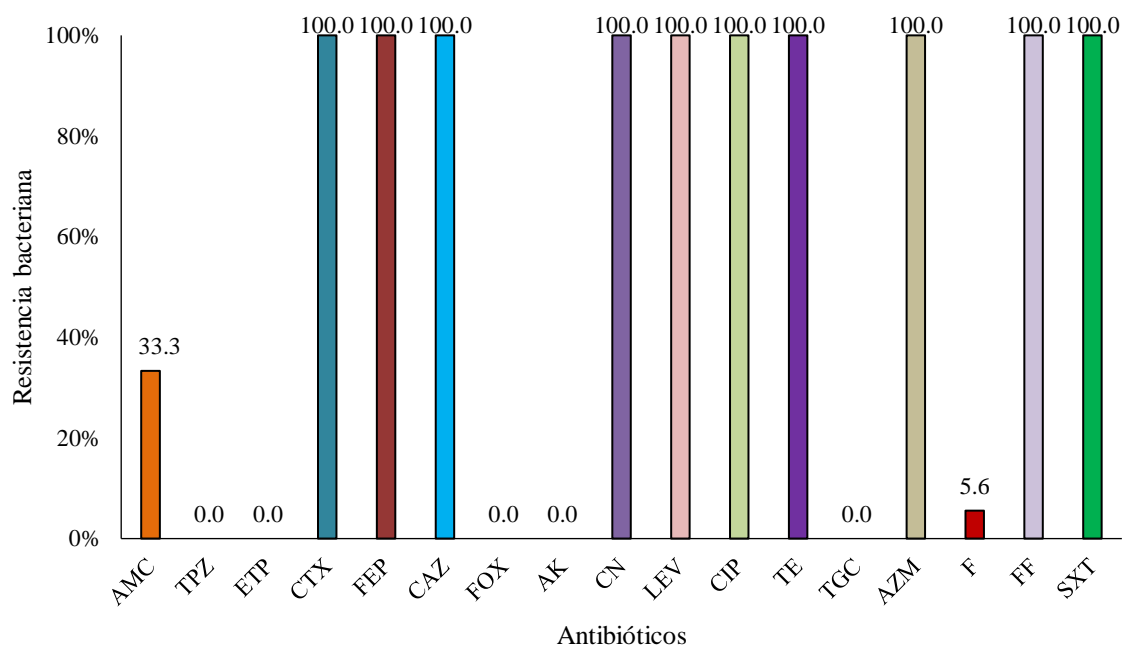
4.3.3 Perfiles de susceptibilidad en muestras de suelo.

Como se muestra en el Anexo 9, se determinó que en las cepas aisladas en muestras de suelo mostraron resistencia del 61.1%, además un perfil intermedio de 8.5% y sensible de 30.4%. De manera que, existe una mayor prevalencia de aislados resistentes en 18 cepas estudiadas pertenecientes al suelo agrícola.

Se encontró que para los antibióticos CTX, FEP, CAZ, CN, LEV, CIP, TE, AZM, FF, SXT los aislados a partir de suelo mantuvieron un porcentaje de resistencia del 100%, en contraste con TPZ, ETP, FOX, AK, TGC (Figura 16). Estos datos indican un gran nivel de la resistencia a varios antibióticos en comparación a las muestras vegetales, debido a la gran

abundancia de bacterias resistentes encontradas en el suelo. Estos valores pueden deberse a los biosólidos provenientes de abono no tratado y del agua de riego que permiten la diseminación de genes de resistencia a antibióticos e integrones asociados con la movilidad genética (Novo, 2022).

Figura 16. Perfil de susceptibilidad en aislados de muestras de suelo ante 17 antibióticos. Las nomenclaturas especifican los diferentes antibióticos empleados: **AMC:** Amoxicilina/ácido clavulánico, **TPZ:** Piperacilina/tazobactam, **ETP:** Ertapenem, **CTX:** cefotaxima, **FEP:** Cefepime, **CAZ:** Ceftazidima, **FOX:** Cefotixitina, **AK:** Amikacina, **CN:** Gentamicina, **LEV:** Levofloxacin, **CIP:** Ciprofloxacina, **TE:** Tetraciclina, **TGC:** Tigeciclina, **AZM:** Azitromicina, **F:** Nitrofurantoina, **FF:** Fosfomicina, **SXT:** Trimetoprima sulfametoxazol. n= 18 aislados de *E. coli*.



El uso de antibióticos en la producción animal y la abundancia de bacterias y plásmidos resistentes a los antibióticos en el estiércol y las aguas residuales, han generado preocupación en las tierras agrícolas para la producción de cultivos. La investigación realizada por Rahube et al., (2014) también indicó resistencia a CTX, TE, SXT en muestras de suelo fertilizadas con lodos de aguas residuales del 67%, debido a la gran carga de bacterias patógenas encontradas. Por lo tanto, existe el riesgo de que el consumo de hortalizas en suelos fertilizados con desechos (humanos/animales) aumente la exposición a bacterias resistentes a los antibióticos y a determinantes genéticos (Rodríguez, 2019).

Los 18 aislados bacterianos mostraron un perfil intermedio en TPZ y AMC con un 83.3 y 50.0% respectivamente como se detalla en la Tabla 8. En la investigación realizada por Holvoet et al., (2013), se determinó una resistencia de 2.9 y 4.7% en TPZ y AMC en 42 aislados resistentes en muestras de suelo al aire libre, siendo cifras bajas en comparación al presente estudio. Además, no se observó resistencia para ETP, FOX y TGC. En suelos agrícolas existen pocos estudios sobre índices de resistencia de ETP y TGC y todavía son considerados como una buena alternativa para el tratamiento de infecciones, debido a su gran capacidad de resistir a *E. coli* y otras bacterias (Celis, 2016) .

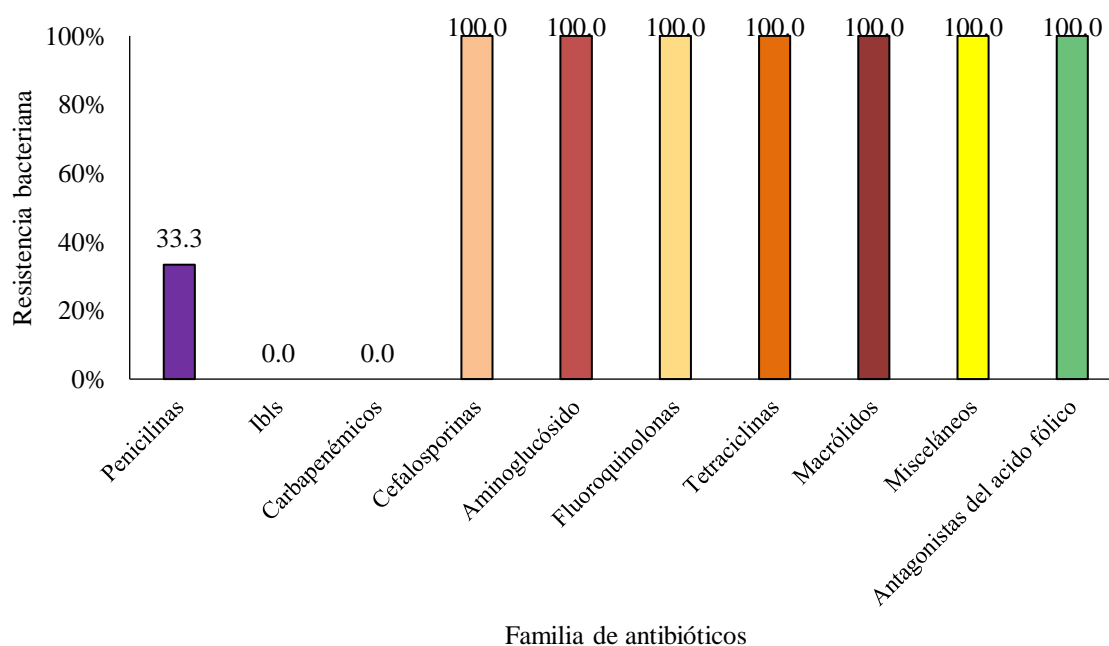
Tabla 2

Perfil de susceptibilidad en aislados de E. coli de muestras de suelo ante 17 antibióticos. Las nomenclaturas especifican los diferentes antibióticos empleados: AMC: Amoxicilina/ácido clavulánico, TPZ: Piperacilina/tazobactam, ETP: Ertapenem, CTX: cefotaxima, FEP: Cefepime, CAZ: Cefotaxidima, FOX: Cefotixitina, AK: Amikacina, CN: Gentamicina, LEV: Levofloxacin, CIP: Ciprofloxacina, TE: Tetraciclina, TGC: Tigeciclina, AZM: Azitromicina, F: Nitrofurantoina, FF: Fosfomicina, SXT: Trimetoprima sulfametoxazol.

Antibióticos	Intermedio (%)	Resistente (%)	Sensible (%)
AMC	50.0	33.3	16.7
TPZ	83.3	0.0	16.7
ETP	0.0	0.0	100.0
CTX	0.0	100.0	0.0
FEP	0.0	100.0	0.0
CAZ	0.0	100.0	0.0
FOX	0.0	0.0	100.0
AK	5.6	0.0	94.4
CN	0.0	100.0	0.0
LEV	0.0	100.0	0.0
CIP	0.0	100.0	0.0
TE	0.0	100.0	0.0
TGC	0.0	0.0	100.0
AZM	0.0	100.0	0.0
F	5.6	5.6	88.9
FF	0.0	100.0	0.0
SXT	0.0	100.0	0.0

Con respecto al perfil de susceptibilidad por familias, los aislados mostraron un 100% de resistencia para las cefalosporinas, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, macrólidos, misceláneos y antagonistas del ácido fólico. De acuerdo con un análisis bibliográfico, existen varios genes dentro de un mismo plásmido que fomentan la resistencia a fosfomicina (familia de los misceláneos) bajo la presión selectiva de otros antibióticos en zonas agrícolas y granjas (Zurfluh et al., 2020). De tal manera, se evidencia una resistencia del 100% en esta familia de los misceláneos en comparación a los aislados de muestras vegetales con un 60.0%. para fosfomicina en este estudio. Sin embargo, para la familia de inhibidores betalactámicos (Ibls) y carbapenémicos no presentaron resistencia, como se detalla en la figura 17.

Figura 17. Perfil de susceptibilidad en los aislados de muestras de suelo por familias de antibióticos.



En la Figura 18 se muestra los perfiles de susceptibilidad de los 174 aislados ante los 17 antibióticos. De acuerdo con los aislados resistentes, en las muestras de suelo se observó una predominancia mayor en comparación con las muestras de agua y vegetales. Se destaca que en los tres tipos de muestras la resistencia a CTX, CAZ son representadas en un 100 y 97.8%, considerándose las más altas. Seguindo de CIP y TE en un 90.3% y 87.7% respectivamente.

Por otro lado, los aislados mostraron sensibilidad principalmente a ETP, FOX, AK, TGC y F. Se observó resistencia para 5 antibióticos en las muestras de agua, para 6 antibióticos en muestras vegetales y 10 antibióticos en muestras de suelo.

Figura 18. Perfil de susceptibilidad general. El color y rangos de resistencia están representados por: 0-33.3% Verde=Bajo, 33.4-66.6% Amarillo=Medio, 66.7-100% Rojo=Alto. Las nomenclaturas especifican los diferentes antibióticos empleados: **AMC:** Amoxicilina/ácido clavulánico, **TPZ:** Piperacilina/tazobactam, **ETP:** Ertapenem, **CTX:** cefotaxima, **FEP:** Cefepime, **CAZ:** Ceftazidima, **FOX-30:** Cefotixitina, **AK:** Amikacina, **CN:** Gentamicina, **LEV:** Levofloxacin, **CIP:** Ciprofloxacina, **TE:** Tetraciclina, **TGC:** Tigeciclina, **AZM:** Azitromicina, **F:** Nitrofurantoina, **FF:** Fosfomicina, **SXT:** Trimetoprima sulfametoxazol.

Tipo de muestra	AMC	TPZ	ETP	CTX	FEP	CAZ	FOX	AK	CN	LEV	CIP	TE	TGC	AZM	F	FF	SXT
Agua	13%	40%	1%	100%	78%	96%	4%	1%	21%	60%	86%	83%	7%	19%	12%	37%	56%
Vegetales	20%	20%	0%	100%	75%	100%	0%	0%	10%	70%	85%	80%	0%	15%	0%	60%	50%
Suelo	33%	0%	0%	100%	100%	100%	0%	0%	100%	100%	100%	100%	0%	100%	6%	100%	100%

4.4 Multirresistencia en los aislados.

Aquellos que han desarrollado resistencias a varios grupos de antimicrobianos, los microorganismos multirresistentes (MMR), están poniendo en peligro la viabilidad del tratamiento de las enfermedades infecciosas (ECODES, 2022). El 99.4% de los aislados presentaron multirresistencia a los antibióticos analizados (Tabla 9). Se detectaron 76 patrones de multirresistencia diferentes para los 174 aislados bacterianos pertenecientes a los tres tipos de muestra. Las muestras de agua presentaron 71 patrones de multirresistencia diferentes, mientras que las muestras vegetales mostraron 12 patrones y las muestras de suelo presentaron solamente 3 patrones.

En esta investigación existieron 30 patrones iguales que representaron la mayor prevalencia en los aislados de tres tipos de muestra. La familia de cefalosporinas (cef) se expresó en todos los perfiles detectados, seguido de fluoroquinolonas (flr), tetraciclinas (te), misceláneos (ff) y antagonistas del ácido fólico (antg). En otro estudio, un análisis en muestras de agua, vegetales y suelo realizada por Holvoet et al., (2013) indicó que, 37 de 54 aislamientos presentaron patrones de multirresistencia con mayor frecuencia en amoxicilina (amc) del 50%, en aislados de muestras de vegetales, suelo y agua de riego de ocho granjas de producción de lechuga. Cabe señalar que, se detectó cuatro aislados resistentes a siete de

los antibióticos empleados en el estudio mencionado. En estudios realizados, varios investigadores señalan la variabilidad de los patrones de resistencia entre las cepas, lo que podría significar una resistencia adquirida en el ambiente.

Por otro lado, afirman que durante el tratamiento de las aguas las poblaciones de bacterias multirresistentes pueden incrementarse o disminuir, debido a los distintos fenómenos de intercambio genético promovido por plásmidos transmisibles por conjugación (Zambrano, 2002). *E. coli* puede producir enzimas betalactámicas cromosómicas o extracromosómicas mediadas por plásmidos, que portan genes de resistencia (transposones) a otros antimicrobianos como aminoglucósidos, tetraciclinas, generando resistencia cruzada que dificulta el tratamiento de las infecciones (García, 2013).

Tabla 3

Aislados multirresistentes. La nomenclatura especifica los diferentes patrones de multirresistencia: amc: penicilinas, ibls: inhibidores de betalactámicos, cef: cefalosporinas, amng: aminoglucósido, flr: fluoroquinolonas, te: tetraciclinas, mcro: macrólidos, ms.: misceláneos, antg: antagonistas del ácido fólico. Los porcentajes (%) correspondientes a los patrones más significativos de acuerdo con el número de aislados.

Patrones de multirresistencia	Muestras							
	Agua		Vegetales		Suelo		Total de aislados	%
	Aislados	%	Aislados	%	Aislados	%		
ibls-cef-flr-te	10	7.4	2	10.0	0	0.0	12	6.9
cef-cn-flr-te-msc-antg	8	5.9	1	5.0	0	0.0	9	5.2
cef-amng-flr-te-mcro-msc-antg	6	4.4	1	5.0	12	66.7	19	10.9
cef-flr-te	5	3.7	0	0.0	0	0.0	5	2.9
cef-flr-te-antg	5	3.7	0	0.0	0	0.0	5	2.9
amc-ibls-cef-flr-te-antg	4	2.9	0	0.0	0	0.0	4	2.3
cef-te	4	2.9	0	0.0	0	0.0	4	2.3
cef-flr-te-msc	4	2.9	1	5.0	0	0.0	5	2.9
cef-flr-te-msc	4	2.9	0	0.0	0	0.0	4	2.3
cef-flr-te-msc-antg	4	2.9	3	15.0	0	0.0	7	4.0
ibls-cef-flr-te	4	2.9	0	0.0	0	0.0	4	2.3
amc-cef-flr-te-msc-antg	3	2.2	1	5.0	0	0.0	4	2.3
cef-flr	3	2.2	0	0.0	0	0.0	3	1.7
cef-te-msc-antg	3	2.2	1	5.0	0	0.0	4	2.3
ibls-cef-flr-te	3	2.2	0	0.0	0	0.0	3	1.7

ibls-cef-flr-mcro-antg	3	2.2	0	0.0	0	0.0	3	1.7
cef-te-antg	2	1.5	0	0.0	0	0.0	2	1.1
cef-flr-te	2	1.5	2	10.0	0	0.0	4	2.3
cef-flr-mcro-antg	2	1.5	0	0.0	0	0.0	2	1.1
cef-amng-flr-te-msc-antg	2	1.5	0	0.0	0	0.0	2	1.1
ibls-cef-flr	2	1.5	0	0.0	0	0.0	2	1.1
ibls-cef-flr-te-antg	2	1.5	0	0.0	0	0.0	2	1.1
ibls-cef-flr-te-f-antg	2	1.5	0	0.0	0	0.0	2	1.1
ibls-cef-amng-flr-te-mcro-msc-antg	2	1.5	0	0.0	0	0.0	2	1.1
cef-te-msc	1	0.7	1	5.0	0	0.0	2	1.1
cef-flr	0	0.0	4	20.0	0	0.0	4	2.3
amc-cef-te-msc-antg	0	0.0	1	5.0	0	0.0	1	0.6
amc-cef-amng-flr-te-mcro-msc-antg	0	0.0	0	0.0	5	27.8	5	2.9
amc-cef-amng-flr-te-mcro-f-msc-antg	0	0.0	0	0.0	1	5.6	1	0.6
amc-ibls-cef-flr-te-mcro-msc-antg	0	0.0	2	10.0	0	0.0	2	1.1
Otros perfiles	46	34	0	0.0	0	0.0	46	26.4
Total	136	100%	20	100%	18	100%	174	100%

4.5 Identificación fenotípica de betalactamasas de espectro extendido BLEE.

Se confirmó que el 100% de 174 aislados, fueron positivos fenotípicamente para la producción de BLEE. Como se observa en la Figura 19, el efecto sinérgico se produce entre los discos de cefotaxima CTX, amoxicilina/ácido clavulánico AMC y ceftazidima CAZ.

Figura 19. Técnica de difusión en agar con los antibióticos cefotaxima (CTX), amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) y ceftazidima (CAZ) en la cepa BLuA1.



La prevalencia de *E. coli* productora de BLEE encontrada es alta (100%), a diferencia de otro estudio donde se encontró el 65% en canales de riego de Sudáfrica (Njage y Buys, 2015). En continentes como Europa y Asia se ha informado una incidencia de *E. coli* BLEE del 78 al 100% respectivamente, en ambientes acuáticos donde participan activamente en la agricultura y ganadería (Zarfel et al., 2017), (Zou et al., 2019).

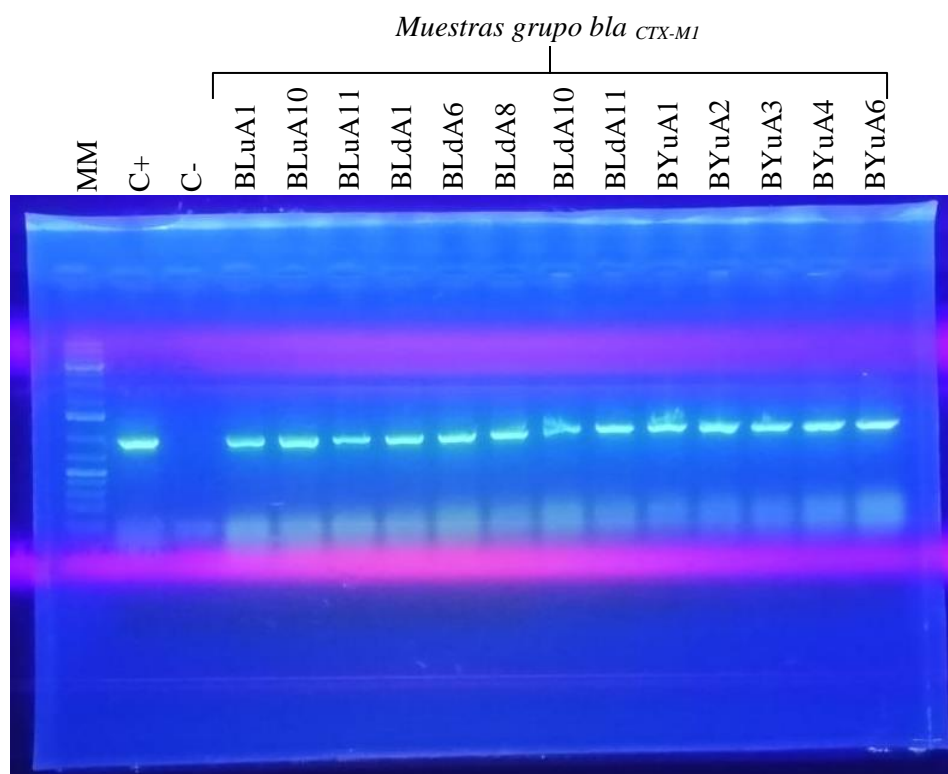
En otras recopilaciones en América del Sur, nuestros resultados son consistentes con la propagación de bacterias BLEE en el ambiente en países como Brasil (100% - lago urbano), Chile (37%-52% agua de riego y vegetales), Bolivia (4.6% - efluente industrial), Colombia (30.3% - canales y ríos) y Ecuador (66.7% - río urbano) (Cho et al., 2023).

Esto indica que los altos niveles de enterobacterias productoras de BLEE, como *E. coli*, en diversos ambientes de agua dulce (incluidos ríos, lagos, arroyos, canales entre otros) varían según la ubicación geográfica donde la actividad antropogénica es mayor. Es decir, en entornos urbanos donde reciben desechos domésticos e industriales, en comparación con las fuentes de agua con menor impacto humano. De esta forma, los factores socioeconómicos, conductuales y ambientales pueden haber causado variaciones regionales entre los países estudiados.

4.6 Detección molecular de la presencia de genes de resistencia.

De las 174 cepas aisladas que fenotípicamente manifestaron producción de BLEE, 92 (79,3%) presentaron genes del grupo CTX-M1, 21 cepas (18,1%) genes del grupo CTX-M9 y finalmente 3 cepas (2.5%) genes del grupo CTX-M8. Se debe recalcar que ninguno de los 174 aislados expresaron genes del grupo CTX-M2, y los genes para la producción de las carbapenemasas *bla_{KPC}* y *bla_{NDM}*. En la figura 20 se muestran las bandas de ADN del grupo CTX-M1 con un tamaño esperado de 800pb, las cuales fueron evaluadas en muestras de agua.

Figura 20. Amplificación del grupo bla_{CTX-M1} de la especie bacteriana E. coli



Estos hallazgos complementan a los resultados de otros estudios locales, regionales y de otros continentes, que plantean preocupaciones globales sobre las infecciones adquiridas por cepas de tipo BLEE productoras de CTX-M (Woerther et al., 2013; García et al., 2019; Hassen et al., 2019; Hedman et al., 2019; Jian et al., 2021). Por ejemplo, en los últimos 12 años se ha evidenciado el resurgimiento de nuevas variantes de CTX-M en toda América de Sur (De, 2011), siendo responsable en muchos casos, de la resistencia a cefalosporinas de tercera generación y cuarta generación.

En el presente estudio, se determinó que CTX-M se correlaciona significativamente con los altos niveles de resistencia a cefalosporinas como: cefotaxima, ceftazidima, cefepime y otro grupo de antibióticos como las fluoroquinolonas con los aislados obtenidos. Con estos resultados y de acuerdo con un análisis bibliográfico, los genes *bla*_{CTX-M} probablemente se estén diseminando en el medio ambiente a través de elementos genéticos móviles como plásmidos, lo que supone un gran riesgo para la salud humana (Tewari et al., 2022).

A nivel de Latino América, Pavez et al., (2019) señala que el grupo CTX-M1 es el más común en aislados hospitalarios (80.0%). Esto en contraste con nuestro estudio que presentó un 79.3% de aislados a nivel ambiental (agua de riego, vegetales y suelo), siendo también cifras que pueden representar relevancia en la transmisión de genes CTX-M en diferentes reservorios. En Ecuador especialmente, se ha observado aislados de *E. coli* BLEE en entornos clínicos, animales y alimentos (Pinguil et al., 2022; Jian et al., 2021); sin embargo, existen pocos estudios en la zona agrícola y canales de riego. Una revisión sistemática confirma que, solo el 20.0% responden a estudios ambientales que reporten la prevalencia del grupo *bla*_{CTX-M1} en países sudamericanos (Bastidas et al., 2022).

El grupo CTX-M9, a pesar de que tenga una alta diseminación a nivel mundial, principalmente en Asia y Europa, hasta con un 63.3% en plantas de tratamiento, por ejemplo (Caltagirone et al., 2017), el porcentaje obtenido en este estudio (18.1%) es bajo en comparación al grupo CTX-M1. Sin embargo, en un estudio ambiental realizado por Ben Said et al., (2015), detectaron también genes BLEE del tipo CTX-M9 en un porcentaje menor (12%) en hortalizas, suelo y agua del entorno agrícola, siendo datos similares con nuestros resultados.

Por otro lado, en otra investigación nacional utilizando aislados clínicos (humanos sanos) y veterinario (animales de engorde), Bastidas et al., (2023) detectaron la prevalencia de los genes CTX-M para el grupo 1 (17.0%) y 9 (20.0%) respectivamente, siendo este último uno de los genes más dominantes en las comunidades rurales del Ecuador. Por lo tanto, en países como Argentina, Bolivia, Colombia, Perú y Venezuela, los grupos (1 y 9) también son evidentes tanto en aislamientos provenientes del hospital como de la comunidad (Varela et al., 2017).

Para el caso del grupo CTXM-8, se ha reportado su prevalencia en menor medida a nivel global, comúnmente más en el continente asiático. En este contexto, de los aislados a partir del agua de riego solo se obtuvieron (2.5%), de los cuales también mostraron resistencia frente a cefotaxima y cefepime (Bonnet et al., 2000). En países sudamericanos como Brasil, sí se ha reportado enterobacterias que albergan CTXM del grupo 8 en plantas de tratamiento de aguas (Dropa et al., 2016).

4.7 Secuenciación y análisis de secuencias de genes CTX-M

Como se muestra en la Tabla 10, el análisis de secuencias obtenidos de aislamientos confirmados para el grupo 1, reveló que el 70.6% de aislados presentaron la variante *bla*_{CTX-M55}. Por otro lado, se obtuvo la variante *bla*_{CTX-M65} con un 11.1% correspondiente al grupo 9 de manera general.

Tabla 4

Variantes de genes de resistencia encontrados en este estudio.

Variantes BLEE		
Grupo	Variante	Cepas
1	CTX-M-15	13 (11.1%)
1	CTX-M-55	82 (70.6%)
9	CTX-M-14	7 (6.03%)
9	CTX-M-65	13 (11.1%)
8	CTX-M-40	3 (2.5%)
		n= 116

Las variantes BLEE detectadas en nuestro estudio corresponden a las variantes BLEE más frecuentes descritas en varios estudios (Tejada et al., 2015; Regino et al., 2021; Baran et al., 2022; Ramos et al., 2023), entre ellas *bla*_{CTX-M15} del grupo 1 (Anexo 11). Esta variante parece ser la más extendida particularmente en *E. coli* en el ámbito hospitalario, sin embargo, también se ha observado en muestras ambientales (Branger et al., 2018). En varios estudios realizados en América Latina, Ecuador es uno de los países que presenta altas tasas de prevalencia de esta variante en aislados clínicos de *E. coli* con el 77% (Soria Segarra et al., 2018). A nivel comunitario, también se ha reportado enterobacterias que albergan *bla*_{CTX-M15} en hortalizas frescas, similar a nuestro estudio (Chelaghma et al., 2021; Ortega-Paredes et

al., 2018). Estos resultados destacan un riesgo potencial para la salud humana asociado con su consumo.

Tabla 5

Variantes de genes de resistencia encontrados en muestras de agua, vegetales y suelo.

Agua		Vegetales		Suelo	
Variante	Cepas	Variante	Cepas	Variante	Cepas
CTX-M-15	9 (10.9%)	CTX-M-15	2 (12.5%)	CTX-M-15	2 (11.1%)
CTX-M-55	53 (64.6%)	CTX-M-55	14 (87.5%)	CTX-M-55	16 (88.9%)
CTX-M-14	7 (8.5%)				
CTX-M-65	12 (14.6%)				
CTX-M-40	3 (3.6%)				

De la misma manera, el genotipo *bla*_{CTX-M55} (grupo 1), es uno de los genes BLEE ampliamente distribuidos en el ambiente y se considera un derivado de *bla*_{CTX-M15}. En un estudio realizado por Yang et al., (2023) y colaboradores menciona que, la frecuente transmisión clonal de *E. coli bla*_{CTX-M55} entre humanos, animales (patos, pollos y cerdos) y el medio ambiente (agua y suelo) representa un amenaza a la salud humana y la producción agrícola. En este caso se obtuvo el 70.6%, siendo el más predominante en los tres tipos de muestra (agua, vegetales y suelo) y con un 64.4% en el agua de riego.

Actualmente, *bla*_{CTX-M55} está presente en el Ecuador en distintos reservorios o alimentos. Aunque la mayoría de los estudios se han centrado en pacientes hospitalizados, se ha demostrado que la comunidad también se ve fuertemente afectada y se recomienda estudios adicionales sobre el entorno genético de *bla*_{CTX-M55} para establecer la dinámica epidemiológica de esta variante, su dispersión, y posible efecto en la salud (Zurita et al., 2016).

Con respecto al grupo CTX-M9, la enzima *bla*_{CTX-M65} está ampliamente distribuida en *E. coli* a nivel mundial, como China, Corea y América del Sur. Se ha informado que *bla*_{CTX-M65}, es uno de los alelos más comunes a nivel comunitario (Bastidas et al., 2023) y ha sido aislada principalmente en humanos, animales de producción y vegetales (Leão et al., 2021). De acuerdo con Ye et al., (2017) y colaboradores, la prevalencia de productores de BLEE en

coliformes transmitidos por el agua de un río urbano osciló entre el 17% para *bla*_{CTX-M65}, siendo un porcentaje mayor, en relación a nuestro estudio con un 14.6% en el agua.

En Ecuador, Montero et al., (2021) también identificaron las variantes alélicas más frecuentes en aislados de agua de riego, incluido *bla*_{CTX-M65} con un 18%, sin embargo, este gen no prevaleció en productos frescos cercanos al canal, similar a nuestra investigación. A nivel local, Plasencia, (2020) obtuvo *E. coli* en muestras vegetales con una prevalencia de este gen únicamente en 4 aislados.

En el caso de *bla*_{CTX-M14} existen pocos estudios en relación con el ambiente, pero su distribución ha sido considerada como una de las más importantes del grupo CTXM-9. Se diversificó gradualmente en animales productores de alimentos en China (Valdés, 2017) y hoy en día, posee la capacidad de invadir prácticamente humanos, animales y ambiente, confiriendo resistencia a cefalosporinas de tercera generación como la ceftazidima (Valdés, 2017). Un estudio realizado por Tacão et al., (2022) en un sistema fluvial, se identificaron cepas de *E. coli* con una prevalencia baja de *bla*_{CTX-M14}.

Por esta razón, tanto los genes *bla*_{CTX-M65} (14.6%) y *bla*_{CTX-M14} (8.5%) del grupo 9, como la variante *bla*_{CTX-M40} (3.6%) del grupo 8, mostraron prevalencia únicamente en muestras de agua de riego. En otro estudio por Ye et al., (2017), aislaron muestras del canal y de lechuga encontrando variantes del grupo CTXM-8 como *bla*_{CTX-M63} y *bla*_{CTX-M8}, sin embargo existen pocos reportes acerca de la variante *bla*_{CTX-M40} en canales de riego.

Cabe recalcar que en 2 cepas aisladas del agua de riego presentaron coexistencia de *bla*_{CTX-M55} y *bla*_{CTX-M65}. La presencia de dos genes pertenecientes al grupo 1 y 9 es posible debido a que los genes de dichos grupos poseen varias regiones homólogas y a la vez otras enzimas recombinantes que pueden emerger en el futuro mediante plásmidos conjugativos (Gundran et al., 2019). De acuerdo con un análisis bibliográfico, los plásmidos IncF estaban frecuentemente asociados con genes CTX-M de *E. coli* (Norizuki et al., 2018).

Los plásmidos IncK pueden facilitar la capacidad de *E. coli* para colonizar el intestino y así mejorar el perfil patogénico de clones específicos o grupos clonales. De manera similar, un estudio por Girlich et al., (2020) menciona que la propagación de estos plásmidos es un factor importante que contribuye a la propagación de *bla*_{CTX-M55} y *bla*_{CTX-M65}. Finalmente, en

este estudio se puede evidenciar que estos genes presentes en el agua de riego podrían asociarse a plásmidos que contribuirían a la alta resistencia de múltiples fármacos, en los próximos años.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Las muestras de suelo, vegetales y agua tomadas en el canal de riego Cananvalle mostraron 174 cepas de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de tercera generación, considerándose una posible fuente de diseminación de bacterias resistentes.
- La caracterización fenotípica demostró la presencia de cepas de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de tercera generación en los tres tipos de muestras.
- Se determinó que el 100% de las cepas bacterianas aisladas fueron productoras de BLEE.
- *E. coli* aislado de los tres tipos de muestra presentó una alta resistencia a los antibióticos CTX, CAZ, FEP, LEV, CIP Y TE, lo que proporciona información clínicamente relevante sobre la resistencia antimicrobiana en la población.
- En la mayoría de los aislados prevaleció el gen *bla*_{CTX-M-55} del grupo 1 con un 70.6% en los tres tipos de muestras analizadas, en concordancia a la alta resistencia a cefalosporinas de tercera generación observado. No se detectó genes de resistencia a los carbapenémicos.

5.2 Recomendaciones

- Implementar la vigilancia continua sobre la calidad microbiológica del agua del canal de riego y vegetales cultivados en los predios cercanos en la ciudad de Ibarra.
- Se sugiere recopilar y ampliar la información con relación a otras especies bacterianas de interés clínico y los patrones de multirresistencia en el canal de riego Cananvalle u otras zonas geográficas de la ciudad y así comprender la dinámica de la resistencia antimicrobiana, en función de los factores ambientales.
- Se recomienda ampliar el estudio a otros genes de resistencia presentes en el medio ambiente y su interacción con el sistema hospitalario, para obtener una visión más amplia de la prescripción de antibióticos en la práctica clínica y saber a qué grado está expuesta la población a este problema de salud.
- Se considera importante aplicar técnicas de tipificación molecular, para conocer la relación de clonalidad entre los aislados y así identificar nuevos reservorios o vías de transmisión a nivel poblacional.
- Se recomienda estudiar la presencia de factores de virulencia para establecer la posible ocurrencia de aislados patogénicos de *Escherichia coli* presentes en el canal de riego.
- Se debe analizar diferentes marcadores genéticos para realizar un estudio poblacional e identificar posibles clones epidemiológicos que puedan estar circulando en la ciudad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, R. G., & Vargas, C. M. (2018). Bacterial resistance mechanism. *Diagnóstico*, 57(2), 82–86.
- AEP. (2020). *Ceftarolina*. <https://www.aeped.es/comite-medicamentos/pediamecum/ceftarolina>
- Álvarez, D. (2017). *Universidad Técnica De Ambato Facultad De Ciencias De La Salud Carrera De Laboratorio Clínico*.
- Alvo, A. V, Téllez, V. G., Sedano, C. M., & Fica, A. C. (2016). Conceptos básicos para el uso racional de antibióticos en otorrinolaringología Basic concepts for the rational use of antibiotics in otorhinolaryngology. *Rev. Otorrinolaringología*, 76, 136–147. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/orl/v76n1/art19.pdf>
- Amato, M., Dasí, D., González, A., Ferrús, M. A., & Castillo, M. Á. (2021). Occurrence of antibiotic resistant bacteria and resistance genes in agricultural irrigation waters from Valencia city (Spain). *Agricultural Water Management*, 256. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2021.107097>
- Andrade, V. C., Caetano, T., Mendo, S., & Oliveira, A. J. F. C. de. (2020). Carbapenem resistant Enterobacteriaceae from port areas in São Paulo State (Brazil): Isolation and molecular characterization. *Marine Pollution Bulletin*, 159(September 2019), 111329. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111329>
- Aragón, S. (2011). *Antibióticos de última generación*. 30, 58–63.
- Araújo, S., A.T. Silva, I., Tacão, M., Patinha, C., Alves, A., & Henriques, I. (2017). Characterization of antibiotic resistant and pathogenic *Escherichia coli* in irrigation water and vegetables in household farms. *International Journal of Food Microbiology*, 257, 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.020>
- Arco, J. D. E. L. (2014). *Farmacia Abierta Antibióticos : situación actual*. 28, 29–33.
- Arul, L., Benita, G., & Balasubramanian, P. (2008). *Bioinformation Escherichia coli and Staphylococcus sp . RLHI Bioinformation*. 12, 339–343.

- Arumugham, B. (2022). *Cefalosporinas de tercera generación*. (B. Universidad Rajiv Gandhi de Ciencias de la Salud, F. 2 Salud de la Universidad de Florida, Jacksonville, & N. I. 3 Istituto Nazionale Tumori - IRCCS - Fondazione Pascale, Via Mariano Semmola 80100 (eds.)). StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549881/>
- Astocondor-Salazar, L. (2018). *Artículo de revisión betalactamasas: la evolución del problema*. 2(2), 42–49.
- Barroso González, P., Bocourt Pérez, L., Lugo Moya, D., & Romeu Álvarez, B. (2021). Detección de β -lactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli* aisladas de ecosistemas dulceacuícolas de La Habana. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 73(2), 1–20. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0375-07602021000200003&lng=es&nrm=iso&tlng=en
- Bastidas-Caldes, C., Cisneros-Vásquez, E., Zambrano, A., Mosquera-Maza, A., Calero-Cáceres, W., Yamamoto, Y., Yamamoto, M., Calvopiña, M., & de Waard, J. H. (2023). Co-Harboring of Beta-Lactamases and *mcr-1* Genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from Healthy Carriers and Backyard Animals in Rural Communities in Ecuador. *Antibiotics*, 12(856). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12050856>
- Bastidas-Caldes, C., Romero-Alvarez, D., Valdez-Vélez, V., Morales, R. D., Montalvo-Hernández, A., Gomes-Dias, C., & Calvopiña, M. (2022). Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *Escherichia coli* in South America: A Systematic Review with a One Health Perspective. *Infection and Drug Resistance*, 15(August), 5759–5779. <https://doi.org/10.2147/IDR.S371845>
- BBC. (2011). *NE. coli: ¿bacteria amiga o enemiga?* https://www.bbc.com/mundo/noticias/2011/06/110604_E.coli_buena_o_mala_sao
- Ben Said, L., Jouini, A., Klibi, N., Dziri, R., Alonso, C. A., Boudabous, A., Ben Slama, K., & Torres, C. (2015). Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia. *International Journal of Food Microbiology*, 203, 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.023>
- Betancourt D. (2018). Perfil resistómico en microbioma de lechuga (*Lactuca sativa*) y

- perejilL (*Petroselinum crispum*) en punto de venta en mercados de Monterrey , N.L. y su area metropolitana. *Universidad Autonoma de Nuevo Leon*, 52(81), 83760570.
- Blount, Z. D. (2015). The unexhausted potential of *E. coli*. *ELife*, 4, 1–12. <https://doi.org/10.7554/eLife.05826>
- Bonnet, R., Sampaio, J. L. M., Labia, R., De Champs, C., Sirot, D., Chanal, C., & Sirot, J. (2000). A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(7), 1936–1942. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.7.1936-1942.2000>
- Bougnom, B. P., & Piddock, L. J. V. (2017). *Wastewater for Urban Agriculture: A Significant Factor in Dissemination of Antibiotic Resistance*. 5863–5864. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b01852>
- Bougnom, B. P., Zongo, C., McNally, A., Ricci, V., & Etoa, F. X. (2019). Wastewater used for urban agriculture in West Africa as a reservoir for antibacterial resistance dissemination. *Environmental Research*, 168(June 2018), 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.09.022>
- Branger, C., Ledda, A., Billard-Pomares, T., Doublet, B., Fouteau, S., Barbe, V., Roche, D., Cruveiller, S., Médigue, C., Castellanos, M., Decr, D., Drieux-Rouze, L., Clermont, O., Glodt, J., Tenaillon, O., Cloeckert, A., Arlet, G., & Denamur, E. (2018). Extended-spectrum β -lactamase-encoding genes are spreading on a wide range of *Escherichia coli* plasmids existing prior to the use of third-generation cephalosporins. *Microbial Genomics*, 4(9). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000203>
- Britania. (2016). *Mueller Hinton Agar*. Laboratorios Britania S.A. <http://himedialabs.com/TD/M173.pdf>
- Cabal, A. (2016). *Distribución, cuantificación y caracterización de genes de virulencia de Escherichia coli en reservorios animales, humanos y medioambientales*.
- Cabrera, C. E., Gómez, R. F., & Zúñiga, A. E. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Medica*, 38(2), 149–158.

- Calderón, G., & Aguilar, L. (2016). Infectología Resistencia Antimicrobiana: Microorganismos Más Resistentes Y Antibióticos. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica LXXIII*, 621, 757–763.
- Calipuy, A., Ortiz, M., Parraguez, M., Solsol, A., & Zambrano, R. (2017). Aislamiento e identificación de bacterias uropatógenas en muestras urinarias de mujeres atendidas en una clínica particular de Lima, Perú. *Universidad Peruana Unión*.
- Caltagirone, M., Nucleo, E., Spalla, M., Zara, F., Novazzi, F., Marchetti, V. M., Piazza, A., Bitar, I., De Ciccio, M., Paolucci, S., Pilla, G., Migliavacca, R., & Pagani, L. (2017). Occurrence of extended spectrum β -lactamases, KPC-Type, and MCR-1.2-producing enterobacteriaceae from wells, river water, and wastewater treatment plants in Oltrepò Pavese area, Northern Italy. *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02232>
- Carter, A. (2021). *Lo que debes saber sobre los antibióticos*. Medical News. <https://www.medicalnewstoday.com/articles/es/antibioticos>
- Carvajal., E., Hernández A., W., Torres C., M., López V., D., Rueda G., E., & Vásquez de Díaz, M. C. (2019). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* strains isolated from the bursa of Fabricius in broilers. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 30(1), 430–437. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i1.14648>
- Castañeda, J., Gómez, K., Corrales, L., & Cortés, S. (2016). Perfil de resistencia a antibióticos en bacterias que presentan la enzima NDM-1 y sus mecanismos asociados: una revisión sistemática A profile of resistance in bacteria and the mechanisms associated due to the presence of the enzyme NDM-1: a systematic re. *Nova*, 13(25), 95–111. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v14n25/v14n25a08.pdf>
- Castillo, D. (2018). *Escherichia coli en aguas de riego: optimización del aislamiento mediante cultivo y detección por PCR*. 1–22. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/109090/CASTILLO - Escherichia coli en aguas de riego%3A optimización del aislamiento mediante cultivo y de....pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Celis Bustos, Y. A. (2016). *Resistencia a antibióticos en E. coli y S. aureus aislados de*

fuentes animales y ambientales. 01–161.
<https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/59538>

- Celis Bustos, Y. A., Vanesa Rubio, V., & Camacho Navarro, M. M. (2017). Perspectiva histórica del origen evolutivo de la resistencia a antibióticos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(2), 105–117. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.69501>
- Cerqueira, F., Matamoros, V., Bayona, J., & Piña, B. (2019). Science of the Total Environment Antibiotic resistance genes distribution in microbiomes from the soil-plant-fruit continuum in commercial *Lycopersicon esculentum* fields under different agricultural practices. *Science of the Total Environment*, 652, 660–670. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.268>
- Chanseyha, C., Sadiq, M. B., Cho, T. Z. A., & Anal, A. K. (2018). Prevalence and analysis of antibiotic resistant genes in *Escherichia coli* and salmonella isolates from green leaf lettuce. *Chiang Mai Journal of Science*, 45(3), 1274–1286.
- Chelaghma, W., Loucif, L., Bendahou, M., & Rolain, J. M. (2021). Vegetables and fruit as a reservoir of β -lactam and colistin-resistant gram-negative bacteria: A review. *Microorganisms*, 9(12), 1–21. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122534>
- Cho, S., Jackson, C. R., & Frye, J. G. (2023). Freshwater environment as a reservoir of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of Applied Microbiology*, 134(3), 1–22. <https://doi.org/10.1093/jambio/lxad034>
- Christaki, E., Marcou, M., & Tofarides, A. (2020). Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *Journal of Molecular Evolution*, 88(1), 26–40. <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09914-3>
- CLSI. (2022). *CLSI*.
- Collignon, P. (2009). Resistant *Escherichia coli*-We are what we eat. *Clinical Infectious Diseases*, 49(2), 202–204. <https://doi.org/10.1086/599831>
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 822–880. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>

- Darphorn, T. S., Hu, Y., Koenders-Van Sintanneland, B. B., Brul, S., & Ter Kuile, B. H. (2021). Multiplication of ampc upon exposure to a beta-lactam antibiotic results in a transferable transposon in *Escherichia coli*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17). <https://doi.org/10.3390/ijms22179230>
- De, D. E. C. E. N. C. (2011). *DE CTX-M EN CEPAS DE 1995 Y 2007 Natalia María Aratti Suárez. 27.*
- Del, D. C. R., & Rocha, C. (2019). *Estudio molecular de la resistencia a antibióticos β - lactámicos y quinolonas de cepas clínicas de Escherichia coli .*
- Díaz, M., Peña, E., Vanegas, E., & Camacho, G. (2014). Efectividad y seguridad de la cefotaxima para el tratamiento de niños con meningitis bacteriana aguda asociada a la comunidad Reporte N o 116 Diciembre de 2014. *Instituto de Evaluación Tecnológica En Salud .* <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2017/07/847054/reporte-cefotaxima.pdf>
- Dropa, M., Lincopan, N., Balsalobre, L. C., Oliveira, D. E., Moura, R. A., Fernandes, M. R., da Silva, Q. M., Matté, G. R., Sato, M. I. Z., & Matté, M. H. (2016). Genetic background of novel sequence types of CTX-M-8- and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from public wastewater treatment plants in São Paulo, Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(5), 4953–4958. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6079-5>
- Dunjo, P., Alonzo, M., & Weiler, N. (2022). *Artículo Original / Original Article Resistencia antimicrobiana en Escherichia coli de muestras cecales de bovinos para carne faenados en frigoríficos de la zona del arroyo Mburicao , Asunción- Antimicrobial resistance in Escherichia coli from cecal sampl. 20(3), 51–59.*
- ECDC. (2015). *¿ Cómo se propaga la resistencia a los antibióticos ?*
- ECODES. (2022). *LA RESISTENCIA A LOS FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS DESDE LA PERSPECTIVA “ONE HEALTH.”*
- Enríquez, J., & Peralta, X. (2015). Determinación de la presencia de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de *Escherichia coli* aisladas de muestras de orina de pacientes de la Fundación Pabli Jaramillo. In *Universidad de Cuenca.*

<http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/22460/1/tesis.pdf>

Expósito, L., Bermellón, S., Lescaille, L., Delgado, N., & Aliaga, I. (2019). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* in patients with urinary tract infection. *Revista Información Científica*, 98(6), 755–764. <http://scielo.sld.cu/pdf/ric/v98n6/1028-9933-ric-98-06-755.pdf>

FAO. (2023). *No Title*. <https://www.fao.org/news/story/es/item/1170073/icode/>

Flores, R. (2019). *Extended-Spectrum B-Lactamase and Plasmid Ampc B-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Water Sources for Irrigation in Maica'S Zone, Cochabamba*. 22(2), 15–21. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S1817-74332019000200003&script=sci_arttext

Fonseca, J. M., Fallon, S. D., Sanchez, C. A., & Nolte, K. D. (2011). *Escherichia coli* survival in lettuce fields following its introduction through different irrigation systems. *Journal of Applied Microbiology*, 110(4), 893–902. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04942.x>

Galindo-Méndez, M. (2018). Molecular characterization and antimicrobial susceptibility pattern of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* as cause of community acquired urinary tract infection. *Revista Chilena de Infectología*, 35(1). <https://doi.org/10.4067/s0716-10182018000100029>

García-Hernández, A. M., García-Vázquez, E., Hernández-Torres, A., Ruiz, J., Yagüe, G., Herrero, J. A., & Gómez, J. (2011). [Bacteraemia due to *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBL): clinical relevance and today's insights]. *Revista Espanola de Quimioterapia : Publicacion Oficial de La Sociedad Espanola de Quimioterapia*, 24(2), 57–66. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21666996>

García. (2010). Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica-Elsevier*. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70003-3](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70003-3)

García. (2013). Extended spectrum beta-lactamase - positive *Escherichia coli*. Resistance. *Sanidad Militar*, 69(4), 244–248. <https://doi.org/10.4321/s1887-85712013000400003>

- García Castellanos, T., Castillo Marshal, A., & Salazar Rodríguez, D. (2014). Mechanisms of resistance to beta-lactams in Gram-negative bacteria. *Revista Cubana de Salud Pública*, 40(1), 129–135.
- García, M., Lapeña, A., González, E., Langarita, E., Monterde, J., & Turón, J. (2022). La Resistencia a Los Fármacos Antimicrobianos Desde La Perspectiva “One Health.” *Ecodes*. https://ecodes.org/images/que-hacemos/05.Cultura_Sostenibilidad/SALud_medioambiente/2022_Observatorio_Cambio_Climatico_y_Salud.pdf
- Gekenidis, M. T., Qi, W., Hummerjohann, J., Zbinden, R., Walsh, F., & Drissner, D. (2018a). Antibiotic-resistant indicator bacteria in irrigation water: High prevalence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 13(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207857>
- Gekenidis, M. T., Qi, W., Hummerjohann, J., Zbinden, R., Walsh, F., & Drissner, D. (2018b). Antibiotic-resistant indicator bacteria in irrigation water: High prevalence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 13(11), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207857>
- Gil, Z. A., Núñez, J. L., Benevidez, E. A., & López, E. L. (2014). Detección de los genes SHV, TEM Y CTX-M en cepas de *Escherichia coli* β -lactamasas de espectro extendido procedentes de un Hospital de Chiclayo-Perú. *Revista Del Cuerpo Médico Del Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo*, 7(3), 27–30. http://www.cmhnaaa.org.pe/pdf/v7-n3-2014/RCM-V7-N3-2014_pag27-30.pdf
- Giménez, V., Padilla, N., Arroyo, A., Godoy, Y., Terán, Y., & Petit-Jiménez, D. (2020). Evaluación De La Calidad Microbiológica Y Efecto Del Lavado En Lechuga. *Revista Científica A.S.A*, 33–54.
- Girlich, D., Bonnin, R. A., & Naas, T. (2020). Occurrence and Diversity of CTX-M-Producing *Escherichia coli* From the Seine River. *Frontiers in Microbiology*, 11(December). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.603578>
- Gonz, B., Infect, P., & Zain, B. (2012). Cefalosporinas parenterales. *Revista de Enfermedades Infecciosas En Pediatría*, 25.26(99), 109–113.

- González Mendoza, J., Maguiña Vargas, C., & González Ponce, F. de M. (2019). La resistencia a los antibióticos: un problema muy serio. *Acta Medica Peruana*, 36(2), 145–151. <https://doi.org/10.35663/amp.2019.362.816>
- González, L., González-leyva, M. D. L. Á., & Zayas-, A. M. (2017). Relación genética de aislados clínicos de *Escherichia coli* productores de Beta-Lactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en un hospital de la Habana, Cuba. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 48(3), 107–112.
- Gonzalez, M. (2013a). *Caracterización fenotípica de cepas de Escherichia coli uropatógena (UPEC) en pacientes pediátricos y sus perfiles de resistencia a aminoglucósidos , quinolonas y betalactámicos* . <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/1546/1/uy24-16734.pdf>
- Gonzalez, M. (2013b). *Caracterización fenotípica de cepas de Escherichia coli uropatógena (UPEC) en pacientes pediátricos y sus perfiles de resistencia a aminoglucósidos , quinolonas y betalactámicos* . 1–28.
- González Rocha, G., Vera Leiva, A., Barría Loaiza, C., Carrasco Anabalón, S., Lima, C., Aguayo Reyes, A., Domínguez, M., & Bello-Toledo, H. (2017). Infectología al Día KPC: Klebsiella pneumoniae carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias KPC. *Infectología Al Día*, 34(5), 476–484. www.sochinf.cl
- Gruenberg, K. G. B. J. (2021). Actualizaciones clínicas en cefalosporinas. In *Diagnóstico clínico y tratamiento 2021*. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=3002§ionid=253509016>
- Guadarrama, M. E., & Galván, A. (2015). Impact of using wastewater in agriculture. *Revista Iberoamericana de Las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*, 4.
- Guerra, J. (2020). *EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE AGUA PARA EL USO EN EL CULTIVO DE ARROZ (Oryza sativa L) CANTÓN DAULE, PROVINCIA DE GUAYAS*.
- Gundran, R. S., Cardenio, P. A., Villanueva, M. A., Sison, F. B., Benigno, C. C., Kreausukon,

- K., Pichpol, D., & Punyapornwithaya, V. (2019). Prevalence and distribution of bla CTX-M, bla SHV, bla TEM genes in extended- spectrum β - Lactamase- producing *E. coli* isolates from broiler farms in the Philippines. *BMC Veterinary Research*, *15*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1975-9>
- Hasan, T. H., & Al-Harmoosh, R. A. (2020). Mechanisms of antibiotics resistance in bacteria. *Systematic Reviews in Pharmacy*, *11*(6), 817–823. <https://doi.org/10.31838/srp.2020.6.118>
- Holvoet, K., Sampers, I., Callens, B., Dewulf, J., & Uyttendaele, M. (2013). Moderate prevalence of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from lettuce, irrigation water, and soil. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(21), 6677–6683. <https://doi.org/10.1128/AEM.01995-13>
- Hölzel, C. S., Tetens, J. L., & Schwaiger, K. (2018). Unraveling the role of vegetables in spreading antimicrobial-resistant bacteria: A need for quantitative risk assessment. *Foodborne Pathogens and Disease*, *15*(11), 671–688. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2501>
- Hutchings, M., Truman, A., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, *51*(Figure 1), 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
- Inyinbor, A. A., Tsopmo, A., & Udenigwe, C. C. (2021). Antibiotics threats on vegetables and the perils of low income nations practices. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, *21*(April), 100448. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2021.100448>
- Jafari, E., Oloomi, M., & Bouzari, S. (2021). Characterization of antimicrobial susceptibility, extended-spectrum β -lactamase genes and phylogenetic groups of Shigatoxin producing *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea in Iran. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *20*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12941-021-00430-1>
- Jiménez A, T. A. (2011). Mecanismos de resistencia a los antibióticos de importancia clínica en enterobacterias. *Centro Nacional de Referencia En Bacteriología Laboratorio de Antimicrobianos*, 15.

[https://www.inciensa.sa.cr/vigilancia_epidemiologica/Manuales/Mecanismos de resistencia a los antibioticos en enterobacterias.pdf.pdf](https://www.inciensa.sa.cr/vigilancia_epidemiologica/Manuales/Mecanismos_de_resistencia_a_los_antibioticos_en_enterobacterias.pdf)

Jiménez, K. B., Jiménez, L. C., & Andrés, M. A. (2022). The impact of the antibiotic resistance on the sustainable development. *Poblacion y Salud En Mesoamerica*, 19(2). <https://doi.org/10.15517/psm.v0i19.47590>

Jokinen, C. C., Hillman, E., & Tymensen, L. (2019). Sources of generic *Escherichia coli* and factors impacting guideline exceedances for food safety in an irrigation reservoir outlet and two canals. *Water Research*, 156, 148–158. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.03.013>

Jongman, M., & Korsten, L. (2016). Genetic diversity and antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolates from different leafy green production systems. *Journal of Food Protection*, 79(11), 1846–1853. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-117>

Jørgensen, S., Søråas, A., Arnesen, L., Leegaard, T., Sundsfjord, A., & Jenum, P. A. (2017). A comparison of extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* from clinical, recreational water and wastewater samples associated in time and location. *PLoS ONE*, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186576>

Kim, H. S., Chon, J. W., Kim, Y. J., Kim, D. H., Kim, M. sang, & Seo, K. H. (2015). Prevalence and characterization of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in ready-to-eat vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 207. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.049>

Leão, C., Clemente, L., Moura, L., Seyfarth, A. M., Hansen, I. M., Hendriksen, R. S., & Amaro, A. (2021). Emergence and Clonal Spread of CTX-M-65-Producing *Escherichia coli* From Retail Meat in Portugal. *Frontiers in Microbiology*, 12(July), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.653595>

León, P., & Vázquez, G. (2018). Prevalencia de *Escherichia coli*, productora de BLEE en pacientes ambulatorios de la ciudad de Cuenca. *Revista Científica Digital Inspilip*. <http://www.inspilip.gob.ec>

Leonor, R., Barrios, A., Alberto, C., Sierra, S., Del, J., & Jaimes, C. (2015). *Antibiotic*

resistant bacteria in aqueous ecosystems. 10(2), 160–172.

Lifonzo, S., Tamariz, P., & Champi, R. (2015). SENSIBILIDAD A FOSFOMICINA EN *Escherichia coli* PRODUCTORAS DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO. *Revista Perú Medicina Experimental y de Salud Pública*, 91(1), 42–45. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.351.3566.68>

Lopardo, H. (2020). Antibioticos Clasificacion, Estructura, Mecanismos De Accion Y Resistencia. *Libros de Cátedra*, 191. [www/Desktop/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf](http://www.Desktop/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf)

Lopardo, H. A., Predari, S. C., & Vay, C. (2011). Bacterias de importancia clínica. *Manual de Microbiología Clínica de La Asociación Argentina de Microbiología*, 1, 11–73. <https://www.aam.org.ar/descarga-archivos/Parte21Enterobacterias.pdf>

López, K. (2015). Validación del método filtración por membrana para análisis microbiológico de coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas marinas Membrane filtration method validation to total coliforms Se colocó en el centro de la unidad de Siembra Una vez filtrada l. 33, 215–220.

López, O., León, J., Jiménez, M., & Chaidez, C. (2009). Detección y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Salmonella* en agua y suelo agrícola. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32(2), 119–126. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802009000200007

López Velandia, D. P., Torres Caycedo, M. I., & Prada Quiroga, C. F. (2016). Genes de resistencia en bacilos Gram negativos: Impacto en la salud pública en Colombia. *Universidad y Salud*, 18(1), 190–202. <https://doi.org/10.22267/rus.161801.30>

Lösch, L. S., & Merino, L. A. (2012). Susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos de *Escherichia coli* provenientes de diversas fuentes de agua del Chaco (Argentina). *Higiene y Sanidad Ambiental*, 12(124), 913–917.

María, O., & Mellado, D. (2020). Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *Septiembre, 2020*, 88–111.

- Marrero, C., Mora Llanes, M., Hernández Fillor, R. E., Báez Arias, M., García Morey, T., & Espinosa Castaño, I. (2017). Identification of enterobacteria producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in pig farms in Matanzas province. *Rev. Salud Anim*, 39(3), 2224–4697.
- Mau, S., Vega, K., & Araya, M. (2011). Aislamiento de bacterias del suelo y su potencial utilización en sistemas de tratamiento de aguas residuales. *Revista de Ciencias Ambientales*, 42(2), 45. <https://doi.org/10.15359/rca.42-2.4>
- Mejía, R. J., Sosa, L. F. G., López, J. A. A., & Lara, P. D. L. (2017). Caracterización molecular de *Escherichia coli* resistente a antibióticos aislada de mastitis bovina en Michoacán, México. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 8(4), 387–396. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v8i4.4251>
- Mendieta Astudillo, V., Gallegos Merchan, J. D., & Peña Cordero, S. J. (2021). Frecuencia de (BLEE) (AmpC) y CARBAPENEMASAS en muestras de urocultivo, en cepas de *Escherichia coli* de origen comunitario. *Revista Vive*, 4(11), 387–396. <https://doi.org/10.33996/revistavive.v4i11.101>
- Montero, L., Irazabal, J., Cardenas, P., Graham, J. P., & Trueba, G. (2021). Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing-*Escherichia coli* Isolated From Irrigation Waters and Produce in Ecuador. *Frontiers in Microbiology*, 12(October), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.709418>
- Moon, S. H., Udaondo, Z., Abram, K. Z., Li, X., Yang, X., DiCaprio, E. L., Jun, S. R., & Huang, E. (2022). Isolation of AmpC- and extended spectrum β -lactamase-producing Enterobacterales from fresh vegetables in the United States. *Food Control*, 132(April 2021). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108559>
- Morejón, M. (2013). Betalactamasas de espectro extendido. *Revista Cubana de Medicina*, 52(4), 272–280.
- Moreno-Monge, K. M. (2013). Terapéutica Médica Carbapenémicos : Tipos Y Mecanismos De Resistencia. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica LXX*, 608(608), 599–605. <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/608/art8.pdf>

- Moreno Rodríguez, J. M., Gelvez Pardo, I. M., & Santos Díaz, A. M. (2020). Guía de muestreo de suelo para análisis microbiológico. In *Guía de muestreo de suelo para análisis microbiológico*. <https://doi.org/10.21930/agrosavia.nbook.7404098>
- Mueller M, T. C. (2023). Infección por *Escherichia coli*. NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564298/>
- Naturales, C., Moreno-Samaniego, M. I., & Ochoa-Pilco III Joselyn, J. (2021). Caracterización microbiológica de muestras de aguas servidas pre filtradas de la comunidad de San Vicente de las Casas de la provincia de Chimborazo (Microbiological characterization of pre-filtered served water samples from San Vicente de las Casas community in Ecuador). *Revista de Microbiología y Inmunología Clínica*, 6(9), 112–130. <https://doi.org/10.23857/pc.v6i9.3013>
- Navarro, F., Calvo, J., Cantón, R., Fernández-Cuenca, F., & Mirelis, B. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(7), 524–534. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.011>
- Navarro, J. R. (2020). *Jrn1De1*.
- Njage, P. M. K., & Buys, E. M. (2015). Pathogenic and commensal *Escherichia coli* from irrigation water show potential in transmission of extended spectrum and AmpC β -lactamases determinants to isolates from lettuce. *Microbial Biotechnology*, 8(3), 462–473. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12234>
- Nocua, L. C., Cortés-Luna, J. A., Leal-Castro, A. L., Arias-León, G. F., Ovalle-Guerro, M. V., Saavedra-Rojas, S. Y., Buitrago-Gutiérrez, G., Escobar-Pérez, J. A., & Castro-Cardozo, B. (2017). Anti-microbial sensitivity of enterobacteria identified in community-acquired urinary tract infection in pregnant women in 9 Colombian hospitals. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 68(4), 275–284. <https://doi.org/10.18597/rcog.928>
- Norizuki, C., Kawamura, K., Wachino, J. I., Suzuki, M., Nagano, N., Kondo, T., & Arakawa, Y. (2018). Detection of *Escherichia coli* producing CTX-M-1-group extended-spectrum β -lactamases from pigs in Aichi Prefecture, Japan, between 2015 and 2016. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 71(1), 33–38.

<https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2017.206>

Novo, C. (2022). Alerta sobre aguas residuales: un estudio destaca el riesgo de resistencia a los antimicrobianos. *Spain Smart Water Summit 2023*. <https://www.iagua.es/noticias/redaccion-iagua/alerta-aguas-residuales-estudio-destaca-riesgo-resistencia-antimicrobianos>

O'Flaherty, E., Solimini, A. G., Pantanella, F., De Giusti, M., & Cummins, E. (2019). Human exposure to antibiotic resistant-*Escherichia coli* through irrigated lettuce. *Environment International*, 122(July 2018), 270–280. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.11.022>

Odonkor, S. T., & Addo, K. K. (2018). Prevalence of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Drinking Water Sources. *International Journal of Microbiology*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7204013>

OIE. (2019). Resistencia a los Antimicrobianos. *Organización Mundial de Sanidad Animal*. <https://www.woah.org/es/que-hacemos/iniciativas-mundiales/resistencia-a-los-antimicrobianos/>

Oliveira, M., Truchado, P., Cordero-García, R., Gil, M. I., Soler, M. A., Rancaño, A., García, F., Álvarez-Ordóñez, A., & Allende, A. (2023). Surveillance on ESBL-*Escherichia coli* and Indicator ARG in Wastewater and Reclaimed Water of Four Regions of Spain: Impact of Different Disinfection Treatments. *Antibiotics*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020400>

OMS. (2018). *E. coli*.

Ongay-Larios, L., & Códiz Huerta, G. (2021). Secuenciación de ADN por el método de terminación de la cadena de Sanger. *Mensaje Bioquímico*, 45, 23–34. <http://bq.facmed.unam.mx/tab>

Ortega, M. (2017). Determinación de Beta-lactamasas de Espectro Extendido en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* a través de pruebas moleculares en urocultivos provenientes de pacientes ambulatorios con infecciones de vías urinarias Mayra Sofía Ortega Ortega Mayra Sofí. In *Universidad San Francisco de Quito USFQ*.

Palomino, C., & González, Y. (2014). Molecular techniques for detection and identification

- of pathogens in food: Advantages and limitations. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 31(3), 535–546.
- Pavez, M., Troncoso, C., Osses, I., Salazar, R., Illesca, V., Reydet, P., Rodríguez, C., Chahin, C., Concha, C., & Barrientos, L. (2019). High prevalence of CTX-M-1 group in ESBL-producing enterobacteriaceae infection in intensive care units in southern Chile. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 23(2), 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2019.03.002>
- Peña, D., & Silva, J. L. (2019). *The Role of Pathogenic E. coli in Fresh Vegetables : Behavior , Contamination Factors , and Preventive Measures.*
- Perez Cardona, H. (2017). *Modelo bioinformático para predecir la resistencia a antibióticos a partir del genoma de una Bacteria.* 153. [https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/62924/Modelo bioinformático para predecir la resistencia a antibióticos a partir del genoma de una Bacteria.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/62924/Modelo_bioinformático_para_predecir_la_resistencia_a_antibióticos_a_partir_del_genoma_de_una_Bacteria.pdf?sequence=2&isAllowed=y)
- Pérez, & Sosa Espinosa, A. E. (2010). Evaluación de la tolerancia a la crioconservación de dos cepas de *Escherichia coli* K12 de uso frecuente en biotecnología. *Vaccimonitor*, 19(2), 11–17.
- Perozo, A. J. (2009). Detección de betalactamasas de espectro extendido en cepas de la familia enterobacteriaceae. *Kasmera*, 37(1), 25–37.
- Pesantez, D. I. E., & Sanchez, G. F. E. (2021). Enzymatic resistance in pseudomonas aeruginosa, clinical and laboratory aspects. *Revista Chilena de Infectología*, 38(1), 69–80. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182021000100069>
- Pinguil Yugsi, M. E., Estevez Montalvo, E., Andrade Campoverde, D., & Fernanda Alvarado, M. (2022). *Escherichia coli* productora de BLEE de origen comunitario e intrahospitalario. *Revista Vive*, 5(14), 518–528. <https://doi.org/10.33996/revistavive.v5i14.165>
- Pinto, A. (2020). *CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE Escherichia coli VEROTOXIGÉNICA EN PRODUCTOS VEGETALES COMERCIALIZADOS EN LOS*

PRINCIPALES MERCADOS DE IBARRA (Vol. 21, Issue 1).
<http://mpoc.org.my/malaysian-palm-oil-industry/>

Plasencia, A. (2020). *CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE Escherichia coli PRODUCTORES DE B-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO EN VEGETALES CRUDOS COMERCIALIZADOS EN IBARRA.*

Quingaluiza, R. (2019). Cuantificación de indicadores de contaminación fecal en ríos y canales de agua de riego de cinco provincias del Ecuador. In *Universidad Tecnica de Ambato* (Issue May).

QuiñonesPérez Dianelys. (2017). Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque “Una salud”. *Revista Cubana de Medicina Tropical. Medicina Tropical*, 69(3), 69–3.
<https://revistas.unheval.edu.pe/index.php/repis/article/view/224/211>

Rada, A. M., Hernández-Gómez, C., Restrepo, E., & Villegas, M. V. (2019). Distribución y caracterización molecular de betalactamasas en bacterias Gram negativas en Colombia, 2001-2016. *Biomédica*, 39, 199–220. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4351>

Rahube, T. O., Marti, R., Scott, A., Tien, Y. C., Murray, R., Sabourin, L., Zhang, Y., Duenk, P., Lapen, D. R., & Topp, E. (2014). Impact of fertilizing with raw or anaerobically digested sewage sludge on the abundance of antibiotic-resistant coliforms, antibiotic resistance genes, and pathogenic bacteria in soil and on vegetables at harvest. *Applied and Environmental Microbi*Rahube, T. O., Marti, R., Scott, A., Tien, Y. C., Murray, R., Sabourin, L., Zhang, Y., Duenk, P., Lapen, D. R., & Topp, E. (2014). *Impact of Fertilizing with Raw or Anaerobically Digested Sewage Sludge on the Abundance Of* , 80(22), 6898–6907. <https://doi.org/10.1128/AEM.02389-14>

Ramon-Pardo, P., Sati, H., & Galas, M. (2018). “One health” approach in the actions to address antimicrobial resistance from a Latin American standpoint. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 35(1), 103–109.
<https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.351.3605>

Ratshilingano, M. T., du Plessis, E. M., Duvenage, S., & Korsten, L. (2022). Characterization of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Two Commercial Lettuce and

- Spinach Supply Chains. *Journal of Food Protection*, 85(1), 122–132. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-125>
- Raza, S., Shin, H., Hur, H. G., & Unno, T. (2022). Higher abundance of core antimicrobial resistant genes in effluent from wastewater treatment plants. *Water Research*, 208(August 2021), 117882. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117882>
- Reddy, B., & Dubey, S. K. (2019). River Ganges water as reservoir of microbes with antibiotic and metal ion resistance genes: High throughput metagenomic approach. *Environmental Pollution*, 246, 443–451. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.022>
- Reddy, N., Shungube, M., Arvidsson, P. I., Baijnath, S., Kruger, H. G., Govender, T., & Naicker, T. (2020). A 2018–2019 patent review of metallo beta-lactamase inhibitors. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 30(7), 541–555. <https://doi.org/10.1080/13543776.2020.1767070>
- Rincón, G., Ginestre, M., Romero, S., Castellano, M., & Ávila, Y. (2010). Calidad microbiológica y bacterias enteropatógenas en vegetales tipo hoja. *K Asmera*, 38(2), 97–105.
- Rivera-Jacinto, M., Rodríguez-Ulloa, C., Flores Clavo, R., Serquén López, L., & Arce Gil, Z. (2015). Betalactamasas de espectro extendido tipo TEM y CTX-M en *Klebsiella spp* y *Escherichia coli* aisladas de superficies de ambientes hospitalarios. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 32(4), 752. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2015.324.1768>
- Rivera, A., Larrosa, N., Mirelis, B., & Navarro, F. (2014). Importancia de los controles de calidad para la detección de la resistencia a antibióticos β -lactámicos en enterobacterias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(SUPPL.1), 30–36. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(14\)70147-8](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(14)70147-8)
- Rizvi, S. G., & Ahammad, S. Z. (2022). COVID-19 and antimicrobial resistance: A cross-study. *Science of the Total Environment*, 807, 150873. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150873>
- Robles, J. M. G. (2017). EVALUACIÓN DE DESINFECTANTES PARA EL CONTROL

DE MICROORGANISMOS EN FRUTAS Y VERDURAS. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 18, 9–22.
<https://www.redalyc.org/journal/813/81351597002/html/>

Rodriguez, N. (2019). La contaminación del suelo: una realidad oculta. In *Organizacion de las Naciones Unidas para la alimentacion y la agricultura FAO*.
<http://www.fao.org/3/I9183ES/i9183es.pdf>

Roland, R. K. (2000). *In vitro antimicrobial activity of piperacillin/tazobactam in comparison with other broad-spectrum beta-lactams*.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11063554/>

Rosell, G. (2021). *Artículo One Health , Hacia Un Abordaje*.

Ross, J., Larco, D., Colon, O., Coalson, J., Gaus, D., Taylor, K., & Lee, S. (2020). Índices de resistencia a los antibióticos en aislamientos clínicos en Santo Domingo, Ecuador. *Práctica Familiar Rural*, 5(1), 29–39. <https://doi.org/10.23936/pfr.v5i1.144>

Rovira, M. A. (2015). *Microbiología para humanos: E. coli*.
<https://microbiologiaparahumanos.wordpress.com/2020/01/15/Escherichia-coli/>

Rubio, S., Pacheco-Orozco, R. A., Gómez, A. M., Perdomo, S., & García-Robles, R. (2020). Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. *Universitas Médica*, 61(2). <https://doi.org/10.11144/javeriana.umed61-2.sngs>

Salmanov, A. G., Ushkalov, V. O., Shunko, Y. Y., Piven, N., Vygovska, L. M., Verner, O. M., & Kushnirenko, S. (2021). One Health: Antibiotic-Resistant Bacteria Contamination in Fresh Vegetables Sold At a Retail Markets in Kyiv, Ukraine. *Wiadomosci Lekarskie (Warsaw, Poland : 1960)*, 74(1), 83–89.
<https://doi.org/10.36740/wlek202101116>

Sapkota, S., Adhikari, S., Khadka, S., Adhikari, M., Kandel, H., Pathak, S., Pandey, A., & Pandey, A. (2019). Multi-drug resistant extended-spectrum beta-lactamase producing *E. coli* and *Salmonella* on raw vegetable salads served at hotels and restaurants in Bharatpur, Nepal. *BMC Research Notes*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4557-9>

- Soria Segarra, C., Soria Baquero, E., & Cartelle Gestal, M. (2018). High Prevalence of CTX-M-1-Like Enzymes in Urinary Isolates of *Escherichia coli* in Guayaquil, Ecuador. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, 24(4), 393–402. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0325>
- Sosa, A. (2003). Verificación rápida de la pureza microbiológica de bancos de *Escherichia coli* K12. *Quality Progress*, 35(13), 84–85.
- Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Beta-lactam antibiotics. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
- Sulis, G., Sayood, S., & Gandra, S. (2022). Antimicrobial resistance in low- and middle-income countries: current status and future directions. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 20(2), 147–160. <https://doi.org/10.1080/14787210.2021.1951705>
- Tacão, M., Laço, J., Teixeira, P., & Henriques, I. (2022). CTX-M-Producing Bacteria Isolated from a Highly Polluted River System in Portugal. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(19). <https://doi.org/10.3390/ijerph191911858>
- Tejada Llacsá, P. J., Huarcaya, J. M., Melgarejo, G. C., Gonzales, L. F., Cahuana, J., Pari, R. M., Bohorquez, H. L., & Chacaltana, J. (2015). Caracterización de infecciones por bacterias productoras de BLEE en un hospital de referencia nacional. *Anales de La Facultad de Medicina*, 76(2), 161. <https://doi.org/10.15381/anales.v76i2.11143>
- Terrazas, B. (2019). *Escherichia coli*. https://unamglobal.unam.mx/global_revista/Escherichia-coli-la-estrella-de-rock-bacteriana/#:~:text=E.,varía dependiendo de la cepa).
- Tewari, R., Ganaie, F., Venugopal, N., Mitra, S., Shome, R., & Shome, B. R. (2022). Occurrence and characterization of genetic determinants of β -lactam-resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. *Infection, Genetics and Evolution*, 100(August 2021), 105257. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105257>
- Udikovic-Kolic, N., Wichmann, F., Broderick, N. A., & Handelsman, J. (2014). Bloom of resident antibiotic-resistant bacteria in soil following manure fertilization. *Proceedings*

of the National Academy of Sciences of the United States of America, 111(42), 15202–15207. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409836111>

UNEP. (2017). Resistencia a los antimicrobianos: investigar la dimensión ambiental. *Fronteras 2017. Nuevos Temas de Interés Ambiental. Programa de Las Naciones Unidas Para El Medio Ambiente, Nairobi.*, 978-92-807-3683-0, 12–23.

Valdés, M. Á. S. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Medicas*, 16(3), 402–419. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2017000300011

Van Der Linden, I., Cottyn, B., Uyttendaele, M., Vlaemynck, G., Heyndrickx, M., & Maes, M. (2013). Survival of enteric pathogens during butterhead lettuce growth: Crop stage, leaf age, and irrigation. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(6), 485–491. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1386>

Van Elsas, J. D., Semenov, A. V., Costa, R., & Trevors, J. T. (2011). Survival of *Escherichia coli* in the environment: Fundamental and public health aspects. *ISME Journal*, 5(2), 173–183. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.80>

Varela, Y., Millán, B., & Araque, M. (2017). Diversidad genética de cepas extraintestinales de *Escherichia coli* productoras de las betalactamasas TEM, SHV y CTX-M asociadas a la atención en salud Genetic diversity of extraintestinal *Escherichia coli* strains producers of beta-lactamases TEM, SHV and. *Biomédica*, 37, 209–226. <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/3324>

Velandia, D. P. L., Torres Caycedo, M. I., Castañeda Orduz, L. M., & Prada Quiroga, C. F. (2016). Determinación de genes que codifican la resistencia de betalactamasas de espectro extendido en bacilos Gram negativos aislados de urocultivos. *Revista Investigación En Salud Universidad de Boyacá*, 3(2). <https://doi.org/10.24267/23897325.182>

Veloso, J. O., Lamaro-Cardoso, J., Neves, L. S., Borges, L. F. A., Pires, C. H., Lamaro, L., Guerreiro, T. C., Ferreira, E. M. A., & André, M. C. P. (2019). Methicillin-resistant and vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* colonizing patients and intensive care

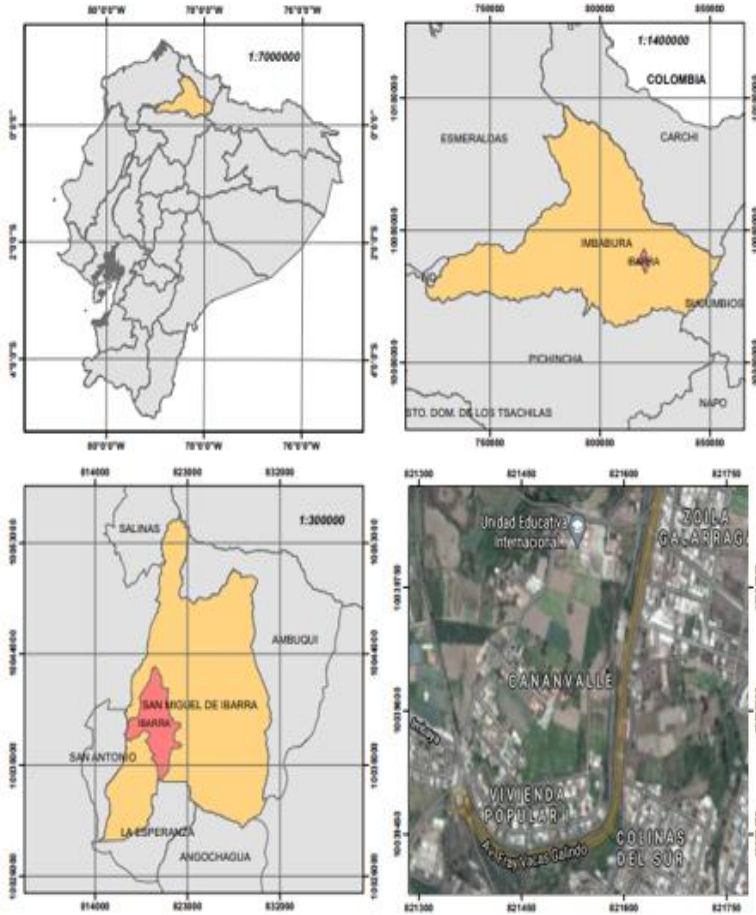
- unit environment: virulence profile and genetic variability. *Apmis*, 127(11), 717–726.
<https://doi.org/10.1111/apm.12989>
- Vidoni, G. E., Pizarro, N. C., & Gai, M. (2020). Resistencia a ciprofloxacina en infecciones urinarias por *Escherichia coli*. *Higiene y Sanidad Ambiental*, 20(1), 1829–1834.
- Vital, P. G., Zara, E. S., Paraoan, C. E. M., Dimasupil, M. A. Z., Abello, J. J. M., Santos, I. T. G., & Rivera, W. L. (2018a). Antibiotic resistance and extended-spectrum beta-lactamase production of *Escherichia coli* isolated from irrigationwaters in selected urban farms in Metro Manila, Philippines. *Water (Switzerland)*, 10(5), 1–11.
<https://doi.org/10.3390/w10050548>
- Vital, P. G., Zara, E. S., Paraoan, C. E. M., Dimasupil, M. A. Z., Abello, J. J. M., Santos, I. T. G., & Rivera, W. L. (2018b). Antibiotic resistance and extended-spectrum beta-lactamase production of *Escherichia coli* isolated from irrigationwaters in selected urban farms in Metro Manila, Philippines. *Water (Switzerland)*, 10(5), 1–11.
<https://doi.org/10.3390/w10050548>
- Wallace, M. J., Fishbein, S. R. S., & Dantas, G. (2020). Antimicrobial resistance in enteric bacteria: current state and next-generation solutions. *Gut Microbes*, 12(1).
<https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1799654>
- Wilman, D. R., Vigo, R., Coli, E., De, A., Atendidos, P., El, E. N., Chilón, S., Luz, Y., Llanos, M. G., Jéssica, D. Q. F., Bardales Valdivia, N., Marco, A., & Rivera, J. (2020). *UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONIO GUILLERMO URRELO Facultad de Ciencias de la Salud RESISTENCIA ENZIMÁTICA A BETALACTÁMICOS EN HOSPITAL REGIONAL DOCENTE DE CAJAMARCA Asesor (a): Co-asesor.*
- Woerther, P. L., Burdet, C., Chachaty, E., & Andremont, A. (2013). Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β -lactamases in the community: Toward the globalization of CTX-M. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 744–758.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00023-13>
- Yang, J.-T., Zhang, L.-J., Lu, Y., Zhang, R.-M., & Jiang, H.-X. (2023). Genomic Insights into Global bla CTX-M-55 -Positive *Escherichia coli* Epidemiology and Transmission Characteristics . *Microbiology Spectrum*, 26. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01089->

- Yauri Bucheli, M. F. (2021). Caracterización molecular de genes de resistencia a β -lactámicos en aislados bacterianos clínicos de la familia Enterobacteriaceae. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 42(1), 63–77. <https://doi.org/10.26807/remcb.v42i1.886>
- Ye, Q., Wu, Q., Zhang, S., Zhang, J., Yang, G., Wang, H., Huang, J., Chen, M., Xue, L., & Wang, J. (2017). Antibiotic-resistant extended spectrum β -lactamase- and plasmid-mediated AmpC-producing enterobacteriaceae isolated from retail food products and the pearl river in Guangzhou, China. *Frontiers in Microbiology*, 8(FEB), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00096>
- Zambrano, J. (2002). *Resistance to antimicrobial agents and plasmids presence in Escherichia coli strains from raw and treated waters of the stabilization ponds for reuse in agriculture.* 22. http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562002000100010&lng=es&nrm=iso
- Zarfel, G., Lipp, M., Gürtl, E., Folli, B., Baumert, R., & Kittinger, C. (2017). Troubled water under the bridge: Screening of River Mur water reveals dominance of CTX-M harboring *Escherichia coli* and for the first time an environmental VIM-1 producer in Austria. *Science of the Total Environment*, 593–594, 399–405. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.138>
- Zhang, A., Call, D. R., Besser, T. E., Liu, J., Jones, L., Wang, H., & Davis, M. A. (2019). β -lactam resistance genes in bacteriophage and bacterial DNA from wastewater, river water, and irrigation water in Washington State. *Water Research*, 161. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.06.026>
- Zou, H., Zheng, B., Sun, M., Ottoson, J., Li, Y., Berglund, B., Chi, X., Ji, X., Li, X., Stålsby Lundborg, C., & Nilsson, L. E. (2019). Evaluating Dissemination Mechanisms of Antibiotic-Resistant Bacteria in Rural Environments in China by Using CTX-M-Producing *Escherichia coli* as an Indicator. *Microbial Drug Resistance*, 25(7), 975–984. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0431>

- Zunino, P. (2018). Historia y perspectivas del enfoque “Una Salud.” *Veterinaria (Montevideo)*, 54(210), 46–51. <https://doi.org/10.29155/vet.54.210.8>
- Zurfluh, K., Treier, A., Schmitt, K., & Stephan, R. (2020). Mobile fosfomicin resistance genes in Enterobacteriaceae—An increasing threat. *MicrobiologyOpen*, 9(12), 1–13. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1135>
- Zurita, J., Ortega-Paredes, D., & Barba, P. (2016). First description of shigella sonnei harboring blaCTX-M-55 outside Asia. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(12), 2224–2227. <https://doi.org/10.4014/jmb.1605.05069>

ANEXOS

Anexo 1. Mapa de ubicación de los puntos de muestreo en el canal de riego Cananvalle.

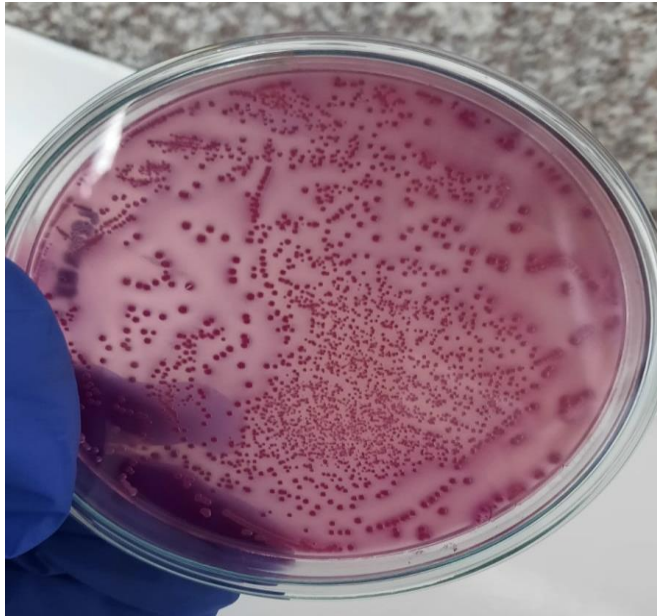


PROYECCIÓN UNIVERSAL TRANSVERSAL DE MERCATOR UTM
DATUM WGS 1984 , ZONA 17 HEMISFERIO SUR

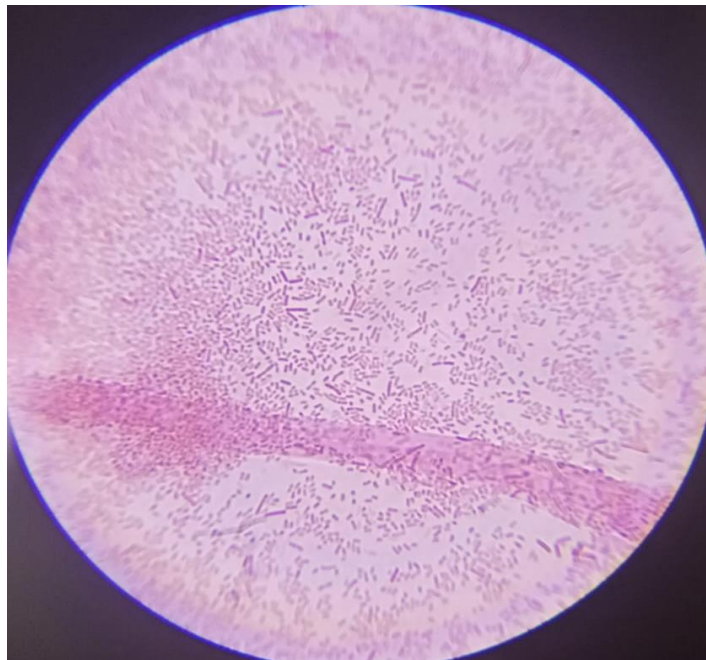


UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE	
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES	
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA	
MAPA DE UBICACIÓN CANAL DE RIEGO CANANVALLE-IBARRA	
ELABORADO POR:	DAYANNA ARMAS, GISSELA VIZCAINO ESCALA DE ELABORACIÓN: 1/250000
ESCALA DE IMPRESIÓN:	VARIAS ESCALAS FUENTE: SIN, 2021
FECHA:	24/2/2021 NUMERO DE MAPA 1 DE 2

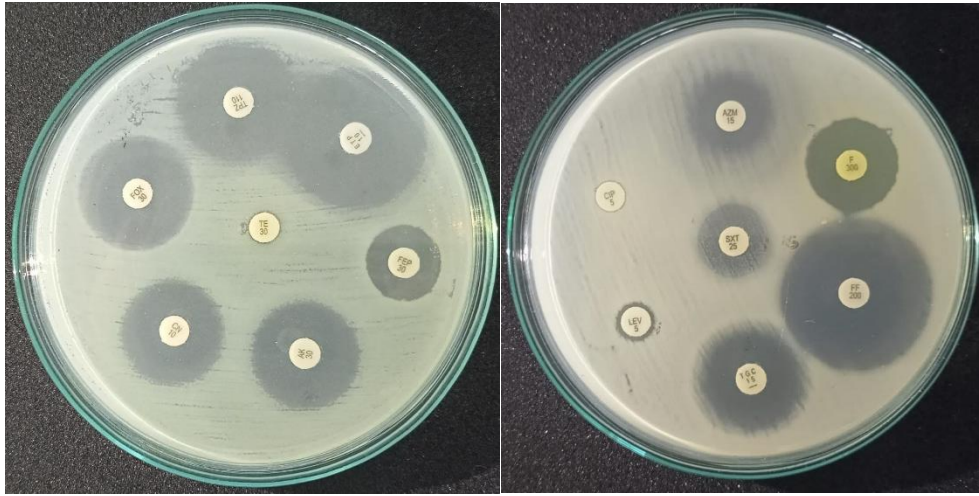
Anexo 2. Aislamiento de *E. coli*.



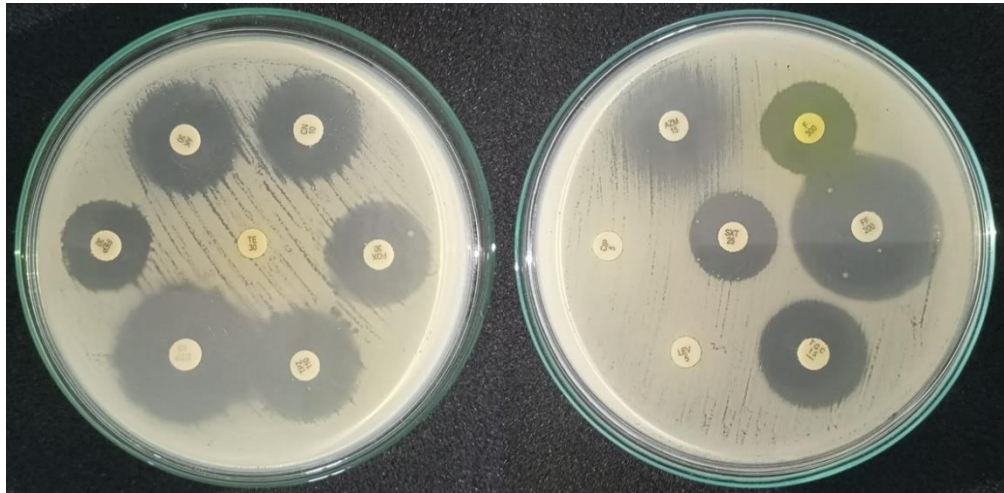
Anexo 3. Identificación mediante tinción Gram.



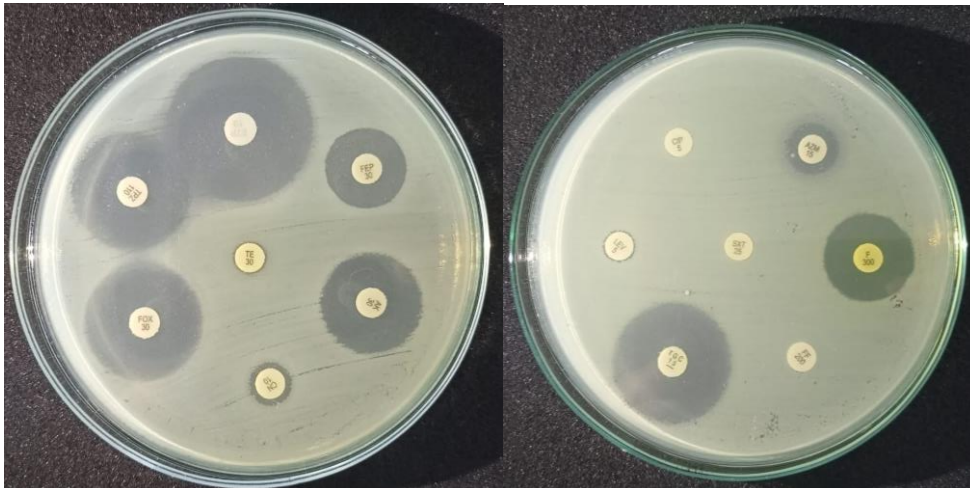
Anexo 4. Antibiogramas obtenidos de las cepas de *E. coli* en muestras de agua.



Anexo 5. Antibiogramas obtenidos de las cepas de *E. coli* en muestras vegetales.



Anexo 6. Antibiogramas obtenidos de las cepas de *E. coli* en muestras de suelo



Anexo 7. Perfil de sensibilidad de cada aislado de muestras de agua ante 17 antibióticos. *El color representa Rojo=Resistente, Amarillo=Intermedio, Verde=Sensible. Los códigos señalan los aislados bacterianos en muestras de agua. La nomenclatura especifica los diferentes antibióticos empleados: AMC: Amoxicilina/ácido clavulánico, TPZ: Piperacilina/tazobactam, ETP: Ertapenem, CTX: cefotaxima, FEP: Cefepime, CAZ: Ceftazidima, FOX: Cefotixitina, AK: Amikacina, CN: Gentamicina, LEV: Levofloxacin, CIP: Ciprofloxacina, TE: Tetraciclina, TGC: Tigeciclina, AZM: Azitromicina, F: Nitrofurantoina, FF: Fosfomicina, SXT: Trimetoprima sulfametoxazol.*

Código	AMC	TPZ	ETP	CTX	FEP	CAZ	FOX	AK	CN	LEV	CIP	TE	TGC	AZM	F	FF	SXT
BLuA1	Verde	Amarillo	Verde	Rojo	Amarillo	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Amarillo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Rojo	Verde
BLuA2	Amarillo	Amarillo	Verde	Rojo	Amarillo	Verde	Verde	Verde	Verde	Amarillo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Rojo	Verde
BLuA3	Amarillo	Rojo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Amarillo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
BLuA4	Verde	Amarillo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Amarillo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
BLuA5	Verde	Amarillo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Amarillo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
BLuA6	Amarillo	Amarillo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Amarillo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
BLuA7	Amarillo	Rojo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Amarillo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
BLuA8	Verde	Amarillo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Verde	Amarillo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
BLuA9	Verde	Rojo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Amarillo	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
BLuA10	Verde	Amarillo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Amarillo	Verde	Verde	Verde	Amarillo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
BLuA11	Rojo	Amarillo	Verde	Rojo	Amarillo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Amarillo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Rojo	Rojo
BLuA12	Rojo	Rojo	Amarillo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Amarillo	Rojo	Rojo	Verde	Rojo	Verde	Verde	Verde
BLuA13	Amarillo	Rojo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Amarillo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Rojo	Rojo
BLuA14	Amarillo	Amarillo	Verde	Rojo	Amarillo	Verde	Verde	Verde	Verde	Amarillo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Rojo	Verde
BLdA1	Verde	Amarillo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Rojo	Verde
BLdA2	Amarillo	Rojo	Amarillo	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Amarillo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
BLdA3	Amarillo	Rojo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Amarillo	Verde	Amarillo	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Rojo	Verde
BLdA4	Amarillo	Rojo	Amarillo	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Rojo
BLdA5	Amarillo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Amarillo	Amarillo	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Amarillo	Verde
BLdA6	Amarillo	Rojo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Amarillo	Amarillo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
BLdA7	Verde	Rojo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Rojo	Amarillo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Verde
BLdA8	Amarillo	Rojo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
BLdA9	Verde	Rojo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Rojo	Amarillo	Amarillo	Rojo	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Verde
BLdA10	Verde	Amarillo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Rojo	Amarillo	Rojo	Rojo
BLdA11	Verde	Rojo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Amarillo	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Rojo	Verde	Rojo
BLdA12	Amarillo	Rojo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Amarillo	Verde	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Amarillo	Verde	Verde
BLdA13	Verde	Amarillo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Amarillo	Verde	Rojo
BLdA14	Amarillo	Amarillo	Verde	Rojo	Amarillo	Verde	Verde	Verde	Verde	Amarillo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Rojo	Verde
BYuA1	Amarillo	Amarillo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Rojo	Verde	Verde	Rojo
BYuA2	Amarillo	Rojo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Amarillo	Verde	Verde	Amarillo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
BYuA3	Amarillo	Amarillo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Rojo	Verde	Rojo
BYuA4	Verde	Rojo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Amarillo	Rojo	Verde	Verde	Verde	Amarillo	Verde	Verde

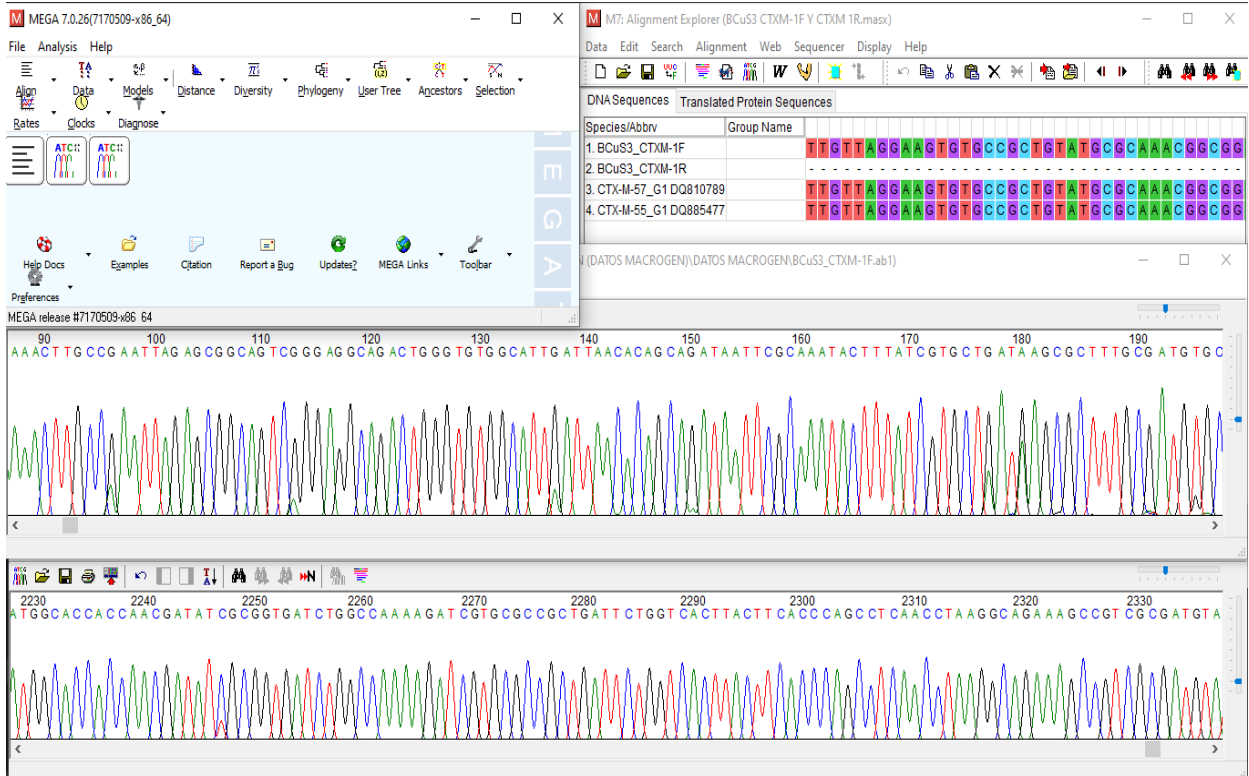
Código	AMC	TPZ	ETP	CTX	FEP	CAZ	FOX	AK	CN	LEV	CIP	TE	TGC	AZM	F	FF	SXT
BYuA5	Green	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Red	Yellow	Red	Red
BYuA6	Green	Yellow	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Yellow	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green
BYdA1	Yellow	Yellow	Green	Red	Yellow	Red	Green	Green	Green	Green	Yellow	Green	Green	Red	Green	Green	Red
BYdA2	Green	Yellow	Green	Red	Yellow	Red	Green	Green	Green	Green	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green
BYdA3	Green	Yellow	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Green	Red
BYdA4	Yellow	Yellow	Green	Red	Yellow	Red	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Green	Red	Green	Green	Red
BYdA5	Green	Yellow	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Yellow	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green
BYdA6	Yellow	Yellow	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Red	Green	Red
BYdA7	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Yellow	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Red
BYdA8	Yellow	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Green	Red	Green	Green	Red
BYdA9	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Red
BYdA10	Yellow	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Yellow	Green	Yellow	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green
BYdA11	Green	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Red	Red
BYdA12	Yellow	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Yellow	Green	Red	Red	Yellow	Green	Red	Yellow	Green	Red
BOuA1	Yellow	Yellow	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Red
BOuA2	Yellow	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Yellow	Green	Red	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Red
BOuA3	Yellow	Red	Green	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Green
BOuA4	Yellow	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Yellow	Red	Red
BOuA5	Yellow	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Yellow	Green	Green
BOuA6	Yellow	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Yellow	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Yellow	Green	Green
BOuA7	Yellow	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Red
BOuA8	Yellow	Red	Green	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Green	Yellow	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green
BOuA9	Green	Yellow	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Yellow	Red	Green	Green	Green	Green	Red
BOuA10	Yellow	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Red
BOuA11	Yellow	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Yellow	Red	Green	Green	Green	Green	Red	Green
BOuA12	Yellow	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Green	Red	Yellow	Green	Green
BOuA13	Yellow	Yellow	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Yellow	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green
BOuA14	Yellow	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Yellow	Red	Red	Green	Green	Yellow	Green	Green
BOuA15	Yellow	Yellow	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Yellow	Green	Red
BOuA16	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Yellow	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Red	Green	Red
BOuA17	Green	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Red
BOuA18	Yellow	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Yellow	Red	Red	Green	Green	Yellow	Green	Green
BOdA1	Yellow	Yellow	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Red	Yellow	Red	Red	Green	Green	Green	Red	Green
BOdA2	Yellow	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green
BOdA3	Yellow	Yellow	Green	Red	Yellow	Red	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Red
BOdA4	Green	Yellow	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Red
BOdA5	Yellow	Yellow	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Yellow	Yellow	Red	Green	Green	Green	Red	Red
BOdA6	Yellow	Yellow	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Red	Yellow	Green	Red
BOdA7	Yellow	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Red	Green	Red
BOdA8	Yellow	Yellow	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Yellow

Anexo 9. Perfil de sensibilidad de cada aislado en muestras de suelo ante 17 antibióticos.

El color representa Rojo=Resistente, Amarillo=Intermedio, Verde=Sensible. Los códigos señalan los aislados en muestras de suelo. La nomenclatura especifica los diferentes antibióticos empleados: **AMC:** Amoxicilina/ácido clavulánico, **TPZ:** Piperacilina/tazobactam, **ETP:** Ertapenem, **CTX:** cefotaxima, **FEP:** Cefepime, **CAZ:** Ceftazidima, **FOX:** Cefotixitina, **AK:** Amikacina, **CN:** Gentamicina, **LEV:** Levofloxacin, **CIP:** Ciprofloxacina, **TE:** Tetraciclina, **TGC:** Tigeciclina, **AZM:** Azitromicina, **F:** Nitrofurantoina, **FF:** Fosfomicina, **SXT:** Trimetoprima sulfametoxazol.

Código	AMC	TPZ	ETP	CTX	FEP	CAZ	FOX	AK	CN	LEV	CIP	TE	TGC	AZM	F	FF	SXT
BCuS1	Verde	Amarillo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Rojo	Verde	Rojo	Rojo
BCuS2	Rojo	Amarillo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Rojo	Amarillo	Rojo	Rojo
BCuS3	Verde	Amarillo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Rojo	Verde	Rojo	Rojo
BCuS4	Rojo	Amarillo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Rojo	Verde	Rojo	Rojo
BCuS5	Amarillo	Amarillo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Rojo	Verde	Rojo	Rojo
BCuS6	Amarillo	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Rojo	Verde	Rojo	Rojo
BCuS7	Amarillo	Amarillo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Rojo	Verde	Rojo	Rojo
BCuS8	Amarillo	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Rojo	Verde	Rojo	Rojo
BCuS9	Rojo	Amarillo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Rojo	Verde	Rojo	Rojo
BCuS10	Rojo	Amarillo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Rojo	Verde	Rojo	Rojo
BCuS11	Amarillo	Amarillo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Rojo	Verde	Rojo	Rojo
BCuS12	Amarillo	Amarillo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Rojo	Verde	Rojo	Rojo
BCuS13	Amarillo	Amarillo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Rojo	Verde	Rojo	Rojo
BCuS14	Rojo	Amarillo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Rojo	Verde	Rojo	Rojo
BCuS15	Amarillo	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Amarillo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Rojo	Verde	Rojo	Rojo
BCuS16	Amarillo	Amarillo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Rojo	Verde	Rojo	Rojo
BCuS17	Rojo	Amarillo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Rojo	Verde	Rojo	Rojo
BCuS18	Verde	Amarillo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Rojo	Verde	Rojo	Rojo

Anexo 10. Análisis de secuencias.



Anexo 11. Variantes de genes de resistencia encontrados en el estudio.

a) Identificación de variantes de los genes encontrados en muestras vegetales

Cepas	CTX M-1	CTX M-9	CTX M-8
Control positivo 1	15	-	-
Control positivo 2	-	14	-
Control positivo 3	-	-	8
BLuA1	-	65	-
BLuA10	-	14	-
BLuA11	-	14	-
BLdA1	-	65	-
BLdA6	55	-	-
BLdA8	55	-	-
BLdA10	55	-	-
BLdA11	15	-	-
BYuA1	15	-	-
BYuA2	55	-	-
BYuA3	55	-	-
BYuA4	55	-	-
BYuA6	55	-	-
BYdA1	55	-	-

BYdA2	15	-	-
BYdA4	-	65	-
BYdA5	55	-	-
BYdA6	55	-	-
BYdA7	55	-	-
BYdA8	55	65	-
BYdA10	55	-	-
BYdA11	15	-	-
BYdA12	15	-	-
BOuA1	55	-	-
BOuA2	-	65	-
BOuA3	55	-	-
BOuA4	55	-	-
BOuA5	15	-	-
BOuA6	15	-	-
BOuA7	55	-	-
BOuA8	55	-	-
BOuA10	-	65	-
BOuA11	15	-	-
BOuA14	55	-	-
BOuA16	55	-	-
BOdA1	55	-	-
BOdA3	55	-	-
BOdA4	55	-	-
BOdA5	55	-	-
BOdA6	-	14	-
BOdA7	-	-	40
BOdA8	55	-	40
BOdA9	55	-	-
BOdA11	55	-	-
BOdA12	55	-	-
BOdA13	55	-	-
BOdA14	55	-	-
BOdA15	55	-	-
BOdA16	55	-	-
BOdA17	55	-	-
BOdA18	55	-	-
BPuA2	55	-	-
BPuA5	-	-	40
BPuA6	55	-	-
BPuA8	55	-	-
BPuA10	55	-	-
BPuA13	55	-	-
BPuA18	55	-	-
BCuA1	-	65	-

BCuA2	-	65	-
BCuA5	-	65	-
BCuA6	-	65	-
BCuA7	-	65	-
BCuA9	-	65	-
BCuA13	-	65	-
BCuA14	-	14	-
BCuA16	-	14	-
BCuA18	55	-	-
BCdA1	55	-	-
BCdA2	55	-	-
BCdA3	55	-	-
BCdA4	55	-	-
BCdA7	55	-	-
BCdA8	55	-	-
BCdA9	55	14	-
BCdA14	55	-	-
BCdA15	-	14	-
BCdA16	55	-	-
BCdA17	55	-	-
BCdA18	55	-	-
BCdA11	55	-	-
BCdA12	15	-	-

b) *Identificación de variantes de los genes encontrados en muestras vegetales.*

CEPAS	CTX M-1	CTX M-9	CTX M-8
BCuC2	15	-	-
BCuC3	55	-	-
BCuC4	55	-	-
BCuL1	55	-	-
BCuL2	55	-	-
BCuL3	55	-	-
BCuL4	55	-	-
BCdC1	15	-	-
BCdC2	55	-	-
BCdC5	55	-	-
BCdC6	55	-	-
BCdL1	55	-	-
BCdL2	55	-	-
BCdL3	55	-	-
BCdL4	55	-	-
BCdL6	55	-	-

c) *Identificación de variantes de los genes encontrados en muestras de suelo.*

CEPAS	CTX M-1	CTX M-9	CTX M-8
BCuS1	55	-	-
BCuS2	55	-	-
BCuS3	55	-	-
BCuS4	55	-	-
BCuS5	55	-	-
BCuS6	55	-	-
BCuS7	55	-	-
BCuS8	55	-	-
BCuS9	55	-	-
BCuS10	55	-	-
BCuS11	15	-	-
BCuS12	55	-	-
BCuS13	15	-	-
BCuS14	55	-	-
BCuS15	55	-	-
BCuS16	55	-	-
BCuS17	55	-	-
BCuS18	55	-	-