

DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE *Escherichia coli*
AISLADA DE AMBIENTE CLÍNICO DE LA CIUDAD DE SAN JUAN DE PASTO

DEISY LORENA GUERRERO CEBALLOS

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO

2019

DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE *Escherichia coli*
AISLADA DE AMBIENTE CLÍNICO DE LA CIUDAD DE SAN JUAN DE PASTO

PRESENTADO POR:

DEISY LORENA GUERRERO CEBALLOS

ASESORES:

EDITH MARIELA BURBANO ROSERO PhD en Ciencias

EDUARDO IBARGÜEN MONDRAGON PhD en Ciencias Matemáticas

UNIVERSIDAD DE NARIÑO

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

SAN JUAN DE PASTO

2019

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en este trabajo de grado son responsabilidades exclusivas de los autores”

Artículo primero del acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966, emanado por el Honorable Consejo Superior de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN

Edith Mariela Burbano Rosero, PhD

Firma del asesor de trabajo de grado

Eduardo Ibargüen Mondragón, PhD

Firma del asesor de trabajo de grado

Bianca Caetano De Almeida, PhD

Firma del jurado

Elsa Irma Quiñones Ramírez, PhD

Firma del jurado

Nadia Catalina Alfonso Vargas, PhD

Firma del jurado



Universidad de Nariño
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIONES,
POSTGRADOS Y RELACIONES INTERNACIONALES

FUNDADA EN 1964



Universidad de Nariño
MAESTRÍA CIENCIAS BIOLÓGICAS
RECIBIDO

DIA: 11 MES: 12 AÑO: 2019

HORA: 10:55 a.m.

QUIEN RECIBE: Susa Ruiz

ACUERDO No. 034 DE 2019
(OCTUBRE 25)

Por el cual se otorga la distinción de Laureada a un trabajo de grado de la Maestría en Ciencias Biológicas.

EL CONSEJO DE POSTGRADOS DE LA UNIVERSIDAD DE NARIÑO
En uso de sus atribuciones legales y reglamentarias y,

CONSIDERANDO

Que según el Estatuto General de la Universidad, la Vicerrectoría de Investigaciones, Postgrados y Relaciones Internacionales VIPRI, es responsable de fomentar el desarrollo de la Investigación y los programas de Postgrados.

Que mediante Acuerdo 025 de abril 27 de 2001, en su artículo 77 se establece: "Corresponde al Consejo de Postgrados otorgar la distinción de Laureada o Meritoria a una tesis o trabajo de grado de programas de postgrado".

Que mediante proposición No. 016 de 24 de septiembre de 2019 del Comité Curricular y de Investigaciones del Programa de Maestría en Ciencias Biológicas, solicita otorgar Distinción Laureada al Trabajo de Grado Titulado "DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA ANTIBIÓTICOS DE LA BACTERIA *Escheichia coli* AISLADA DE AMBIENTE CLÍNICO DE LA CIUDAD DE SAN JUAN DE PASTO", presentado por la egresada DEISY LORENA GUERRERO CEBALLOS identificada con cédula de ciudadanía número 1.085.308.322, de la Promoción de la Maestría en Ciencias Biológicas, que obtuvo una calificación de 100 puntos.

Que en sesión del Consejo de Postgrados del día 25 de octubre de 2019 se dio lectura y revisión a la Proposición No. 016 de 24 de septiembre de 2019, del Comité Curricular y de Investigaciones del Programa de Maestría en Ciencias Biológicas y a los conceptos de los jurados evaluadores, en los que se sustenta la propuesta de distinción meritoria, y que dichos conceptos no dejan vacíos y son completamente sustentados, por tanto se decide otorgar dicha distinción.

Que el Consejo de Postgrados, de conformidad a lo establecido en el Artículo 77 - Parágrafo, del Acuerdo 025 de abril 27 de 2001 del Consejo Superior - Estatuto de Estudios de Postgrados acuerda otorgar la distinción Laureada al trabajo de grado titulado "DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA ANTIBIÓTICOS DE LA BACTERIA *Escheichia coli* AISLADA DE AMBIENTE CLÍNICO DE LA CIUDAD DE SAN JUAN DE PASTO", presentado por la egresada DEISY LORENA GUERRERO CEBALLOS identificada con cédula de ciudadanía número 1.085.308.322, de la Promoción de la Maestría en Ciencias Biológicas, que obtuvo una calificación de 100 puntos.

Que teniendo en cuenta lo anterior.

ACUERDA:

ARTÍCULO 1.

Avelar la propuesta y de conformidad a lo establecido en el Artículo 77 - Parágrafo, del Acuerdo 025 de abril 27 de 2001 del Consejo Superior - Estatuto de Estudios de Postgrados acuerda otorgar la distinción meritoria al trabajo de grado titulado "DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA ANTIBIÓTICOS DE LA BACTERIA *Escheichia coli* AISLADA DE AMBIENTE CLÍNICO DE LA CIUDAD DE SAN JUAN DE PASTO", presentado por la egresada DEISY LORENA GUERRERO CEBALLOS identificada con cédula de ciudadanía número 1.085.308.322, de la Promoción de la Maestría en Ciencias Biológicas, que obtuvo una calificación de 100 puntos.

ARTÍCULO 2.

Otorgar distinción de Laureada al Trabajo de Grado titulado "DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA ANTIBIÓTICOS DE LA BACTERIA *Escheichia coli* AISLADA DE AMBIENTE CLÍNICO DE LA CIUDAD DE SAN JUAN DE PASTO", presentado por la egresada DEISY LORENA GUERRERO CEBALLOS identificada con cédula de ciudadanía número 1.085.308.322, de la Promoción de la Maestría en Ciencias Biológicas, que obtuvo una calificación de 100 puntos, de acuerdo a lo expuesto en la parte considerativa del presente acto administrativo.

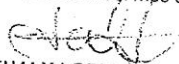
ARTÍCULO 2.

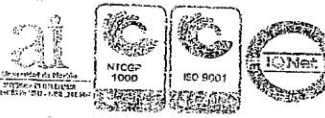
VIPRI, OCARA, Maestría en Ciencias Biológicas anotarán lo de su cargo.

COMUNIQUESE Y CUMPLASE

Dado en San Juan de Pasto, a los 25 días del mes de Octubre de 2019


OSCAR EDUARDO CHECA CORAL
Presidente Consejo Postgrados


NATHALY LORENA SANTACRUZ
Secretaria Consejo Postgrados



AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme estar aquí compartiendo mis metas y alcanzando cada uno de mis sueños.

A mi Familia por su apoyo incondicional y comprensión, ya que hicieron posible la culminación de esta etapa de mi vida y especialmente a mi hermanita Maria Alejandra Delgado, gracias por tu inmenso cariño y nunca dejarme decaer.

Al Grupo de Investigación GIBIMMA, liderado por el Doctor Eduardo Ibarguen Mondragón, PhD por el apoyo incondicional brindado en el desarrollo de la investigación y la generación de modelos matemáticos.

Al Grupo de Investigación Biotecnología Microbiana, liderado por el Doctor Pablo Fernández Izquierdo, PhD por la colaboración brindada.

Al Grupo de Investigación en Producción de Frutales Andinos (GPFA), liderado por el Doctor Tulio Cesar Lagos Burbano, PhD por la disposición brindada para el uso de algunos equipos.

Al Cepario de la Universidad de Nariño liderado por la profesora Orfa Alexandra España, por el apoyo brindado en la consecución de cepas bacterianas ATCC.

Al laboratorio clínico especializado Limitada por toda la colaboración brindada en la consecución e información de los aislados bacterianos de *E. coli* provenientes de muestra de orina.

A la Jefatura de Laboratorios de la Universidad de Nariño por el préstamo de equipos y acceso a las instalaciones de laboratorios de docencia.

Al departamento de Biología y a la Maestría en Ciencias Biológicas por el acompañamiento, compromiso y oportunidades brindadas en el desarrollo de este trabajo.

A mis asesores la Doctora Edith Mariela Burbano Rosero, PhD y el Doctor Eduardo Ibarguen Mondragón, PhD por sus enseñanzas, acompañamiento, sugerencias y paciencia en el desarrollo de la investigación y por ser parte de mi formación como Magister.

A los jurados, las Doctoras Bianca Caetano De Almeida, PhD, Elsa Irma Quiñones Ramírez, PhD y Nadia Catalina Alfonso Vargas, PhD por sus valiosos aportes para la consolidación de este trabajo.

A los profesores de la Maestría en Ciencias Biológicas, los cuales transmitieron sus conocimientos con paciencia y disponibilidad y especialmente a los profesores, Miller Cerón y Sonia Mahecha por el apoyo brindado.

Al personal de laboratorio Maira Quiroz y Alirio Rodríguez quienes brindaron un apoyo incondicional en el trabajo de laboratorio.

Al biólogo Jhonatan Pinta por su apoyo incondicional, consejos y contribución en el desarrollo de esta propuesta de investigación.

A mis compañeros de laboratorio de procesos Microbianos, Maestría en Ciencias Biológicas y a todas aquellas personas que hicieron parte de mi formación académica, gracias por su apoyo, consejos y porque fue un honor compartir con ustedes tantos momentos.

DEDICATORIA

A mi madre Ana Patricia Ceballos por ser mi fuente de motivación, inspiración y fortaleza durante este recorrido, porque, aunque no estés conmigo toda la comprensión, cariño, sacrificio y esfuerzo que me entregaste, son el día de hoy mi más bonito y preciado recuerdo y estoy segura de que cada una de las metas que me he propuesto no las hubiera alcanzado sin tu apoyo incondicional.

A mi segunda madre Alba Gloria Martínez, por ser mi fortaleza y apoyo durante toda mi vida, agradezco tus consejos, enseñanzas, cariño, entrega y sabiduría brindada, ya que fueron pilar fundamental para mi crecimiento personal.

Finalmente quiero dedicar este trabajo a aquella persona que hizo las veces de padre mientras estuvo con vida, mi abuelo Luis Antonio Ceballos, gracias por tus enseñanzas, por inculcarme valores imprescindibles y sobre todo por tu excelente manera de instruirme para afrontar los obstáculos de esta vida; ten por seguro que siempre te llevare en mi corazón.

RESUMEN

La resistencia bacteriana a los antibióticos es una de las mayores problemáticas que se afronta a nivel mundial. Una de las bacterias con mayor preocupación a nivel hospitalario es *Escherichia coli*, patógeno que presenta resistencia por diferentes mecanismos. En la ciudad de Pasto se han reportado cepas de *E. coli*, con resistencia marcada a antibióticos betalactámicos. No obstante, es escaso el conocimiento sobre los determinantes de resistencia; por lo tanto, el objetivo de la investigación fue determinar la resistencia a antibióticos de la bacteria *E. coli* aislada de ambiente clínico en San Juan de Pasto.

Se realizó una descripción macro y microscópica de 32 aislamientos clínicos. También se determinaron el perfil de resistencia, las caracterizaciones bioquímicas y moleculares (amplificación génica de 16S rRNA, ERIC-PCR y genes de resistencia). Adicionalmente, se llevó a cabo un proceso de transformación vía plasmídica y su dinámica fue descrita mediante modelado matemático.

Todos los aislamientos tuvieron resistencia a antibióticos betalactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas; esta resistencia se relacionó con plásmidos portadores de genes de resistencia *bla*TEM, *bla*SHV1 y *bla*CTXM1; además se estableció mediante *ERIC-PCR* la existencia de cuatro estados genéticamente idénticos. Mediante la construcción del árbol filogenético se observó una distancia evolutiva mínima entre los aislados.

En la cinética de crecimiento se observó una relación significativa (p- valor: 0,0000) entre el crecimiento, antibiótico y cepa bacteriana. Las tasas de transformación fueron del orden de $7,8 \times 10^{-4}$ y $5,2 \times 10^{-3}$ en el periodo de 32 a 40 horas, correspondientemente. Los modelos matemáticos para cinética de crecimiento y transformación describieron de manera confiable (errores absolutos $\geq 10\%$) la dinámica de cada fenómeno biológico. Los resultados

de esta investigación son promisorios en el campo de la epidemiología de la resistencia bacteriana, ya que pueden ser tomados como base para implementar estrategias de mitigación de la resistencia.

Palabras clave: *E. coli*, resistencia, antibióticos, plásmidos, modelos matemáticos.

ABSTRACT

Bacterial resistance to antibiotics is one of the biggest problems that is faced worldwide. One of the bacteria with the greatest concern at the hospital level is *Escherichia coli*, a pathogen that has resistance by different mechanisms. In the city of Pasto, strains of *E. coli* have been reported, with marked resistance to beta-lactam antibiotics. However, there is little knowledge about the determinants of resistance against the antibiotics used in the medical field; therefore, the objective of the research was to determine the antibiotic resistance of *E. coli* bacteria isolated from the clinical environment in San Juan de Pasto.

A macro and microscopic description of 32 clinical isolates was made. The resistance profile, biochemical and molecular characterizations (gene amplification of 16S rRNA, ERIC-PCR and resistance genes) were also determined. In addition, a process of transformation via plasmid was carried out and its dynamics were described by mathematical modeling.

All isolates had resistance to beta-lactam antibiotics, aminoglycosides and fluoroquinolones; resistance was related to plasmids carrying with the resistance genes *bla*TEM, *bla*SHV1 and *bla*CTXM1; the *ERIC-PCR* was also established to have four genetically identical states. By the construction of the phylogenetic tree, a minimum evolutionary distance was observed between the isolates.

In the growth kinetics, it was observed a significant relationship (p- value: 0.0000) between growth, antibiotic and bacterial strain. The processing rates were in the order of 7.8×10^{-4} and 5.2×10^{-3} in the period of 32 to 40 hours, correspondingly. Mathematical models for kinetics of growth and transformation described reliably (absolute errors $\geq 10\%$) the dynamics

of each biological phenomenon. The results of this research are promising in the field of the epidemiology of the bacterial resistance, since they can be taken as the basis for implementing mitigation strategies of resistance.

Keywords: *E. coli*, resistance, antibiotics, plasmids, mathematical models.

Tabla de contenido

1. Introducción a la problemática.....	20
---	-----------

2.	Justificación	22
3.	Aporte de la investigación al desarrollo de la ciencia	24
4.	Marco teórico	24
4.1.	Antibióticos	25
4.1.1.	Clasificación de antibióticos según su acción.....	26
4.2.	Mecanismos de resistencia bacteriana	28
4.2.1.	Inactivación del antibiótico por destrucción o modificación de la estructura.	29
4.2.2.	Alteración del sitio blanco del antibiótico.....	30
4.2.3.	Alteraciones de las barreras de permeabilidad.	31
4.3.	Bases genéticas de adquisición de resistencia	32
4.3.1.	Mutación en un gen cromosómico.....	32
4.3.2.	Transposones e integrones.	33
4.3.3.	Plásmidos R de resistencia.	34
4.4.	<i>E. coli</i> multirresistente	36
4.4.1.	Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en <i>Escherichia coli</i>	38
4.4.2.	Mecanismos contra antibióticos betalactámicos.	38
4.4.3.	Mecanismos contra quinolonas	39
4.4.4.	Mecanismos contra tetraciclinas	40
4.4.5.	Mecanismos contra trimetropim – sulfametoxazol.....	40
4.4.6.	Mecanismos contra cloranfenicol.....	41
4.5	Modelos matemáticos	42
5.	Estado del arte.....	43
6.	Objetivos	47
6.1.	Objetivo general.....	47
6.2.	Objetivos específicos	47
7.	Materiales y métodos.....	48
7.1.	Consecución de aislados de <i>E. coli</i>	48
7.2.	Caracterización Microbiológica	48
7.3.	Caracterización molecular	49
7.3.1.	Extracción de DNA Cromosomal.....	49
7.3.2.	Extracción de DNA plasmídico.	50

7.3.3.	Amplificación de genes vinculados a la resistencia a antibióticos de los aislados de <i>E. coli</i> en DNA cromosomal y plasmídico.....	51
7.3.4.	Amplificación de la subunidad 16S rRNA.....	53
7.3.5.	Amplificación de secuencias intergénicas de consenso repetitivas de enterobacterias (<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR, ERIC-PCR</i>)	56
7.4.	Evaluación de la tasa de transformación vía plasmídica de una población de <i>E. coli</i> sensible a antibióticos.....	56
7.4.1.	Cinética de crecimiento.....	59
7.4.2.	Transformación vía plasmídica.....	61
7.5.	Análisis estadístico	62
7.6.	Aproximación a la dinámica de transformación mediante modelado matemático	62
7.6.1.	Identificación de variables y parámetros.	62
7.6.2.	Formulación de los modelos matemáticos.	63
7.6.3.	Simulación numérica y análisis de resultados	69
8.	Resultados y discusión	70
8.1.	Consecución de los aislados de <i>E. coli</i>	70
8.2.	Caracterización Microbiológica	70
8.2.1.	Perfil de resistencia.....	78
8.3.	Caracterización molecular	83
8.3.1.	Extracción de DNA Cromosomal.....	83
8.3.2.	Extracción de DNA plasmídico y análisis de perfiles.....	84
8.4.	Amplificación de genes vinculados a la resistencia a antibióticos de los aislados de <i>E. coli</i> en DNA cromosomal	89
8.5.	Amplificación de genes vinculados a la resistencia a antibióticos de los aislados de <i>E. coli</i> en DNA plasmídico	92
8.6.	Amplificación de la subunidad 16S rRNA	93
8.6.1.	Identificación de los aislados por comparación con las bases de datos RDP y Genbank - análisis filogenético.....	94
8.7.	Amplificación de secuencias intergénicas de consenso repetitivas de enterobacterias (<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR, ERIC-PCR</i>).....	100
8.8.	Evaluación de la tasa de transformación vía plasmídica de una población de <i>E. coli</i> sensible a antibióticos.....	104
8.8.1.	Cinética de crecimiento.....	104
8.8.2.	Transformación vía plasmídica.....	111

8.9.	Aproximación a la dinámica de transformación mediante modelado matemático	119
8.9.1.	Análisis del modelado de la cinética de crecimiento.	120
8.9.2.	Simulación numérica y análisis de resultados para transformación plasmídica	136
9.	Conclusiones.....	142
10.	Recomendaciones.....	143
11.	Bibliografía.....	144
13.	Anexos	157
13.1.	Anexo A Fichas de muestras de Orina provenientes del Laboratorio clínico	158
13.2.	Anexo B. Amplificación genes de resistencia en DNA cromosomal y plasmídico.....	174

Lista de figuras

Figura 1. DiaGrama experimental de cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> y <i>S. enterica</i>	57
Figura 2. DiaGrama experimental de transformación entre población resistente de <i>E. coli</i> y población sensible de <i>S. enterica</i>	59
Figura 3. Características macroscópicas de los aislados de <i>E. coli</i>	71
Figura 4. Coloración de Gram de los aislados de <i>E. coli</i>	72
Figura 5. Pruebas bioquímicas realizadas para los aislados de <i>E. coli</i>	75
Figura 6. Perfil de resistencia de los aislados bacterianos de <i>E. coli</i>	80
Figura 7. Perfil de resistencia a antibióticos (betalactámicos, carbapenémicos, aminoglucosidos, fluoroquinolonas, fosfonatos y trimetoprim/sulfametoxazol) de aislados de <i>E. coli</i>	81
Figura 8. Verificación de extracción de DNA cromosomal.....	83
Figura 9. Perfil plasmídico de los aislados de <i>E. coli</i>	86
Figura 10. Perfil plasmídico de los aislados de <i>E. coli</i>	87
Figura 11. DendroGrama del perfil plasmídico de los aislados de <i>E. coli</i>	89
Figura 12. Verificación de la amplificación de genes de resistencia en DNA cromosomal de aislados de <i>E. coli</i>	91
Figura 13. Verificación de la amplificación de genes de resistencia en DNA plasmídico de aislados de <i>E. coli</i>	93
Figura 14. Verificación de la amplificación de la subunidad 16S rRNA.	95
Figura 15. Árbol filogenético de los aislados de <i>E. coli</i>	100

Figura 16. Verificación de la amplificación <i>ERIC-PCR</i>.	101
Figura 17. Verificación de la amplificación <i>ERIC-PCR</i>.	102
Figura 18. DendroGrama del perfil <i>ERIC-PCR</i> de los aislados de <i>E. coli</i>.	102
Figura 19. Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> en presencia de SXT (0,2 mg /mL).	106
Figura 20. Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> en ausencia de antibiótico.	108
Figura 21. Cinética de crecimiento de <i>S. enterica</i> en presencia de SXT (0,2 mg /mL).	110
Figura 22. Cinética de crecimiento de <i>S. enterica</i> en presencia de SXT (0,2 mg /mL).	111
Figura 23. Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> y <i>S. enterica</i> en presencia de antibiótico (40 horas).	113
Figura 24. Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> y <i>S. enterica</i> en ausencia de antibiótico (40 horas).	115
Figura 25. Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> en presencia de antibiótico (40 horas).	117
Figura 26. Cinética de crecimiento de <i>S. enterica</i> en presencia de antibiótico (40 horas). ..	118
Figura 27. Verificación de la extracción de DNA plasmídico de los tratamientos de transformación.	119
Figura 28. Ajuste de curvas mediante el método de algoritmo genético para poblaciones de bacterias resistentes en ausencia de antibiótico.	122
Figura 29. Ajuste de curvas mediante el método de algoritmo genético para poblaciones de bacterias resistentes en presencia del antibiótico.	124
Figura 30. Ajuste de curvas mediante el método de algoritmo genético para poblaciones de bacterias sensibles en ausencia del antibiótico.	127

Figura 31. Predicción matemática de la cinética de crecimiento de *E. coli* resistente en presencia de antibiótico a las 72 horas..... 130

Figura 32. Predicción matemática de la cinética de crecimiento de *E. coli* resistente en ausencia de antibiótico a las 72 horas.. 132

Figura 33. Predicción matemática de la cinética de crecimiento de *S. enterica* sensible en ausencia de antibiótico a las 72 horas. 134

Figura 34. Ajuste de curvas mediante el método de algoritmo genético para proceso de transformación hasta las 28 horas..... 138

Figura 35. Ajuste de curvas mediante el método de algoritmo genético para proceso de transformación hasta las 40 horas..... 140

Lista de tablas

Tabla 1. <i>Ejemplos relevantes de resistencia codificada por mutaciones bacterianas</i>	33
Tabla 2. <i>Resistencia codificada por plásmidos</i>	36
Tabla 3. <i>Mecanismos de resistencia a cloranfenicol descritos en E. coli</i>	42
Tabla 4. <i>Primers para amplificación de genes de resistencia</i>	52
Tabla 5. <i>Condiciones PCR para amplificación de genes de resistencia</i>	53
Tabla 6. <i>Descripción de las características macroscópicas y microscópicas de los aislados bacterianos de E. coli</i>	73
Tabla 7. <i>Características bioquímicas de los aislados bacterianos de E. coli</i>	76
Tabla 8. <i>Perfil de resistencia de aislados de E. coli a antibióticos.</i>	82
Tabla 9. <i>Perfil plasmídico de los aislados de E. coli provenientes de muestras de orina.</i>	87
Tabla 10. <i>Identificación de las muestras por comparación en RDP y GenBank.</i>	96
Tabla 11. <i>Estimación de parámetros para ajuste de curvas de crecimiento E. coli sin antibiótico.</i>	120
Tabla 12. <i>Estimación de parámetros para ajuste de curvas de crecimiento E. coli con antibiótico.</i>	121
Tabla 13. <i>Estimación de parámetros para ajuste de curvas de crecimiento S. enterica sin antibiótico.</i>	125
Tabla 14. <i>Predicción de crecimiento de poblaciones resistentes de E. coli y sensibles de S. enterica.</i>	128
Tabla 15. <i>Parámetros fijos obtenido de la cinética de crecimiento.</i>	137
Tabla 16. <i>Estimación de parámetros para ajuste de curvas de transformación hasta las 28 horas.</i>	137
Tabla 17. <i>Estimación de parámetros para ajuste de curvas de transformación hasta las 40 horas.</i>	139

1. Introducción a la problemática

El descubrimiento de los antibióticos ha contribuido de manera significativa en el campo de la medicina, constituyéndose en uno de los tratamientos más efectivos para el control de enfermedades causadas por agentes infecciosos que afectan a la población y generan altas tasas de mortalidad (Alós, 2015; Singh, et al., 2018); en este sentido, se considera a los antibióticos como compuestos sintéticos o semisintéticos que ejercen acciones específicas sobre alguna estructura o función del patógeno, inhibiendo o eliminando el crecimiento de dichos organismos; no obstante, microorganismos como las bacterias han desarrollado mecanismos para contrarrestar los efectos de los antibióticos y adaptarse a las nuevas presiones del medio (Maguiña, 2016).

De esta manera la resistencia a los antibióticos es considerada como una manifestación natural de la evolución bacteriana, en la que estos organismos presentan la capacidad de sobrevivir en presencia de los mismos; sin embargo, existen factores que inducen al aumento de la expresión de resistencia, entre estos se destacan: el incremento en el uso inapropiado de antibióticos, la presión selectiva que ejercen y la aplicación ineficiente de las medidas de prevención y control (Alós, 2015). Además, se ha determinado que en ambientes hospitalarios el uso continuo de diversos antibióticos favorece el desarrollo de diferentes mecanismos moleculares de resistencia y selección de cepas multirresistentes (Cabrera, et al., 2007 y Singh, et al., 2018).

Al respecto, la Organización Mundial de la Salud (2015) establece que las bacterias resistentes con mayor preocupación en el ámbito hospitalario son, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Shigella spp*, *Salmonella Typhi*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Escherichia coli*, microorganismos que han desarrollado

mecanismos altamente eficientes para adquirir, almacenar y distribuir genes asociados a la resistencia, actuando como reservorio de genes distribuidos en la comunidad (Claudio, 2016). Igualmente, Hernández y colaboradores (2014) reportan que las bacterias resistentes a antibióticos más frecuentes en unidades de cuidados intensivos (UCI) en Colombia son, *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y principalmente *E. coli*, esta última presenta genes asociados con la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), como cefamicinasas plasmídicas y carbapenemasas (Marsili, 2015).

En el departamento de Nariño, se ha reportado que *E. coli*, es una de las bacterias con mayor impacto epidemiológico en ambientes hospitalarios, ya que presenta una resistencia marcada a diferentes antibióticos. Con relación a esto, el tercer boletín epidemiológico desarrollado por el Hospital Departamental de Nariño en 2015 y 2018, referencian que cepas de *E. coli* presentan resistencia prevalente a antibióticos de amplio espectro (22,8 - 41,7%) y son causales de un aumento en la frecuencia de enfermedades infecciosas de difícil tratamiento.

Cabe señalar que, en el departamento de Nariño, es escaso el conocimiento sobre los determinantes de resistencia contra los principales antibióticos empleados en el ámbito médico; debido, a que únicamente se han generado pruebas preliminares para la detección de resistencia a los antibióticos, pero no se ha llevado a cabo estudios minuciosos de resistencia en bacterias relevantes en este ambiente. Por lo tanto, la presente investigación pretendió determinar la resistencia a antibióticos de *E. coli* aislada de ambiente clínico de la ciudad de San Juan de Pasto, como un primer paso para dilucidar con mayor claridad los patrones de resistencia y facilitar el entendimiento de la epidemiología en el departamento.

En atención a los anteriores argumentos, se planteó la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es la resistencia a antibióticos de la bacteria *E. coli* aislada de ambiente clínico de la ciudad de San Juan de Pasto?

2. Justificación

Las infecciones causadas por bacterias resistentes a antibióticos sugieren un problema de salud pública a nivel mundial, estos microorganismos han desarrollado eficientes mecanismos de resistencia y diseminación de genes asociados a ésta, generando una disminución de la eficacia de los tratamientos habituales y por lo tanto un aumento en la frecuencia de enfermedades infecciosas de difícil tratamiento. Al respecto, se ha determinado que existen bacterias naturalmente resistentes a determinados antibióticos, mientras que otras adquieren resistencia mediante mutaciones en sus genes tras la exposición a estos; esta resistencia natural o adquirida, puede propagarse a otras especies bacterianas, puesto que las bacterias intercambian fácilmente material genético entre ellas, incluso entre especies diferentes (Lopatkin, et al., 2016).

Con respecto a lo anterior, se ha reportado que cepas de *E. coli* presentan diferentes mecanismos de multiresistencia, McGann et al. (2016) reportan la presencia de una cepa de esta bacteria resistente al antibiótico de último recurso, la colistina, por este hecho se la catalogó como una de las bacterias resistentes a los antibióticos disponibles en el mercado, además se indica que estas bacterias son causa frecuente de diferentes infecciones como las del tracto urinario, diarreas, bacteriemias, meningitis neonatal y neumonías. Estas bacterias son difíciles de tratar con los antibióticos existentes, generando complicaciones posteriores, debido que el paciente infectado posiblemente requiere de cuidados adicionales o antibióticos

alternativos más costosos, propiciando un aumento en la tasa de mortalidad y morbilidad, así como un incremento en el coste sanitario (Minsalud, 2018; Morejón, 2013; Morejon, 2013 & OMS, 2015).

La Organización Mundial de la Salud (2015) señala que la situación es mucho más alarmante debido a que factores como el flujo diario de una cantidad considerable de personas entre los diferentes países ha acelerado la propagación de bacterias resistentes a nivel global, hasta el punto de establecer niveles pandémicos de resistencia bacteriana; por otra parte en el 2014, la Organización Panamericana de Salud (OPS) informó que más de 1,4 millones de personas adquirieron infecciones hospitalarias por bacterias multiresistentes; además se señaló que en la unión Europea, fallecen unos 25.000 individuos al año a causa de las bacterias multiresistentes, con un coste adicional de 1.500 millones de euros a los sistemas sanitarios; aunque en el sistema de salud de Colombia no se encuentra información detallada sobre el coste económico de infecciones por resistencia bacteriana, se estima que estos son elevados con base en estudios internacionales reportados (Barrero, et al., 2014).

Por el panorama expuesto, es fundamental desarrollar investigaciones enfocadas en determinar la frecuencia de bacterias de alto impacto epidemiológico, que exhiben resistencia a antibióticos en ambientes hospitalarios; con el fin de generar un mejor entendimiento acerca de los modelos de resistencia y encaminar estrategias de disminución y control en este tipo de ambientes. Por lo tanto, la ejecución de la presente propuesta de investigación permitió evaluar a nivel de laboratorio la resistencia a antibióticos en *E. coli* de impacto epidemiológico en el departamento de Nariño, y crear escenarios de trabajo para determinar posibles patrones de comportamiento teniendo en cuenta la especie bacteriana y en el futuro

generar controles y estrategias de vigilancia que incidan en la progresión de bacterias resistentes.

3. Aporte de la investigación al desarrollo de la ciencia

El estudio brindó información acerca de la resistencia de *E. coli* en el ámbito clínico en nuestra región, relacionando genes y plásmidos vinculados a la resistencia a antibióticos; además mediante métodos experimentales y análisis matemáticos se generó una aproximación del proceso de transformación vía plasmídica en poblaciones sensibles. Los resultados generados pueden servir de base para estudios a nivel epidemiológico en la ciudad de San Juan de Pasto.

4. Marco teórico

La resistencia a los antibióticos es un tema de amplio interés en la comunidad científica, éste puede estudiarse desde diferentes puntos de vista, uno de ellos es según los mecanismos de resistencia; estos mecanismos se pueden evaluar a nivel individual o poblacional. A nivel individual la resistencia está ligada a la interacción molecular entre la célula bacteriana con toda su maquinaria genética y un antibiótico específico; mientras que la resistencia poblacional representa el comportamiento de un inóculo bacteriano o población bacteriana cuando se enfrenta a una concentración específica de un antibiótico en un tiempo determinado, los resultados generados en el análisis de la resistencia poblacional con llevan al desarrollo de controles adecuados para una evaluación terapéutica (Vignoli & Seija, 2007).

4.1. Antibióticos

Un antibiótico es una sustancia química empleada para eliminar o inhibir el crecimiento de organismos infecciosos. En un principio, el término antibiótico sólo se utilizaba para referirse a los compuestos orgánicos producidos por bacterias u hongos que resultaban tóxicos para otros microorganismos, en la actualidad también se emplea el término para denominar compuestos sintéticos o semisintéticos. Los antibióticos son un grupo heterogéneo de sustancias con diferentes comportamientos a nivel farmacocinético (hace referencia a los efectos del organismo sobre el fármaco) y farmacodinámico (hace referencia a los efectos del fármaco sobre el organismo). Los antibacterianos son la principal categoría de antibióticos, estos pueden lesionar de forma selectiva la membrana celular en algunas especies de bacterias como también pueden bloquear la síntesis de proteínas bacterianas; en general, la mayoría de los antibióticos inhibe la síntesis de diferentes compuestos celulares; algunos de los fármacos más empleados interfieren con la síntesis de peptidoglicano, principal componente de la pared celular (Maguiña, 2016).

Existen varias clasificaciones de los antibióticos, la más habitual los agrupa en función de su mecanismo de acción frente a los organismos infecciosos, teniendo en cuenta si lesionan la pared de la célula, si alteran la membrana celular, o si inhiben la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas o intervienen en la síntesis de polímeros constituyentes de la célula bacteriana. Otra clasificación agrupa a los antibióticos en función de las bacterias contra las que son eficaces, por ejemplo, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.* y *E. coli*, además también se pueden clasificar en función de su estructura química. Los antibióticos actúan a través de dos mecanismos; el primero eliminando a los microorganismos existentes,

mecanismo denominado como acción bactericida; el segundo impidiendo su reproducción, determinado como acción bacteriostática (Maguiña, 2016).

4.1.1. Clasificación de antibióticos según su acción.

Antibióticos de acción bactericida

Penicilinas: hacen parte del grupo de antibióticos betalactámicos, actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana, pueden ser de origen natural y semisintético, contienen el núcleo de ácido 6-aminopeniciloico, que consiste en un anillo betalactámico unido a un anillo tiazolidínico. De acuerdo con su origen y espectro de acción pueden clasificarse en; penicilinas naturales y penicilinas resistentes a las penicilinasas estafilocócicas (oxacilina, meticilina y dicloxacilina) (Seija & Vignoli, 2006).

Cefalosporinas: Son productos de origen natural derivados de productos de la fermentación del *Cephalosporium acremonium*. Contienen un núcleo constituido por ácido 7-aminocefalosporánico formado por un anillo betalactámico unido a un anillo de dihidrotiazino. Estas han sido modificadas con diferentes cadenas laterales, dando lugar a tres generaciones bien diferenciadas y al igual que las penicilinas interfieren con la síntesis de la pared celular bacteriana (Seija & Vignoli, 2006).

Aminoglucósidos: presentan dos o más aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un anillo aminociclitol. Actúan mediante su fijación a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano e inhiben la síntesis proteica, lo que conduce finalmente a la muerte del microorganismo (Molina, et al., 2009).

Quinolonas: derivan de una molécula básica formada por una doble estructura de anillo que contiene un residuo N en la posición 1. Diferentes sustituciones, incluyendo la inclusión de residuos de flúor, han derivado desde el ácido nalidíxico hasta las quinolonas fluoradas; las quinolonas son antibióticos bactericidas y actúan inhibiendo la ADN girasa, enzima que cataliza el superenrollamiento del ADN cromosómico, que asegura una adecuada división celular (González & Nieves, 2016).

Carbapenemes: pertenece al grupo de los betalactámicos, presenta un mayor espectro de actividad dentro de este grupo de antibióticos. Imipenem fue el primer carbapenem desarrollado para uso clínico; es un derivado semisintético producido por *Streptomyces* spp. Como otros antibióticos betalactámicos inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana e inducen además un efecto autolítico (González & Nieves, 2016).

Antibióticos de acción bacteriostática

Macrólidos: son antibióticos semisintéticos derivados de la eritromicina producida por *Streptomyces erythreus*. Su mecanismo de acción se basa en unirse a la subunidad 50S del ARN ribosómico en forma reversible. Dicha unión se realiza mediante puentes de hidrogeno con diferentes radicales de la subunidad, provocando un bloqueo en las reacciones de transpeptidación y traslocación (Rivera, 2016).

Tetraciclinas: conjunto de antibióticos naturales o semisintéticos, presentan un núcleo tetracícliconaftaceno; actúan inhibiendo la biosíntesis proteica a nivel de los ribosomas 70 y 80S, y por tal interfieren en la transcripción impidiendo la penetración del RNA mensajero al interior de la subunidad 30S del ribosoma (N'Guyen & Baumard, 2013).

Cloranfenicol: Es un antibiótico capaz de matar a gran número de bacterias, pero tiene como efecto secundario la aparición de anemia aplásica (desarrollo incompleto o defectuoso de las líneas celulares de la médula ósea); por esta razón su uso se limita a gotas oftálmicas y para oídos. Actúa uniéndose a la fracción 50S del ribosoma impidiendo la transpeptidación entre los aminoácidos de la cadena peptídica, con lo que impide la elongación de la cadena en crecimiento. El mecanismo de resistencia más importante es extracromosómico, y se debe a un plásmido adquirido por conjugación (Colmenares, et al., 2015).

Sulfamidas: son antibióticos sintéticos, bacteriostáticos, de amplio espectro; su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos bacterianos. En la mayoría de las bacterias Gramnegativas la resistencia a sulfamidas se debe a la adquisición de plásmidos portadores de variantes mutadas del gen *DHPS* (Martínez, et al., 2014).

4.2. Mecanismos de resistencia bacteriana

Las infecciones generadas por bacterias multirresistentes causan un aumento en la tasa de mortalidad y morbilidad, así como un incremento en el costo sanitario; debido a que estas enfermedades requieren de tratamientos no convencionales y en algunas ocasiones ningún tipo de tratamiento es eficaz para incidir en la progresión de la infección. Uno de los factores que ha contribuido en la aparición de bacterias resistentes, es el uso inadecuado de antibióticos, ya que han ejercido una presión selectiva sobre las poblaciones bacterianas; de este modo la resistencia bacteriana, presenta una base genética intrínseca (propia o natural) y una base adquirida (Alos, 2015 & Blair, et al., 2015). La resistencia natural o intrínseca, es un carácter constante propio de cada especie bacteriana, y representa un mecanismo permanente,

determinado genéticamente y sin correlación alguna con la presión ejercida por los antibióticos; un ejemplo de lo citado es la resistencia de *Proteus mirabilis* a las tetraciclinas por un proceso natural de expulsión del antibiótico por la presencia de un lipopolisacárido que disminuye la afinidad de los antibióticos polipeptídicos a su sitio blanco. Por otra parte, la resistencia adquirida es una característica propia de la especie bacteriana, la cual naturalmente es sensible a un determinado antibiótico, pero ha sufrido modificaciones genéticas, ya sea por mutación o adquisición de genes de resistencia mediados por plásmidos, transposones e integrones (Blair, et al., 2015 & Heredia, 2018).

En este sentido, tanto la resistencia natural como adquirida se pueden abordar desde el punto de vista bioquímico, celular y molecular, clasificando estos mecanismos básicos de resistencia en: inactivación del antibiótico por destrucción o modificación de la estructura química, alteración del sitio blanco del antibiótico y alteraciones de las barreras de permeabilidad (Auqui, 2016 & Blair, et al., 2015).

4.2.1. Inactivación del antibiótico por destrucción o modificación de la estructura.

La destrucción o modificación química del antibiótico, es un proceso molecular caracterizado por la producción de enzimas, que llevan a cabo dicha función. Las enzimas más comunes son las betalactamasas, las cuales hidrolizan el núcleo betalactámico rompiendo el enlace amida del anillo peniciloico o cefalosporínico resultando un derivado ácido inactivo, este mecanismo es altamente efectivo y empleado en su mayoría por bacterias Gram negativas y pueden clasificarse, según su forma de producción por: localización genética (cromosomas o plásmidos), exposición genética (constitutiva o inducida), producción primaria (dependiente de microorganismo) y sustrato mayor (depende de la clase de antibiótico); entre estas enzimas

encontramos la eritromicina esterasa y la acetiltransferasa que modifican la estructura del cloranfenicol y también pueden generar modificaciones como las acetilaciones, adenilaciones o fosforilaciones inactivantes de aminoglucósidos, lincosamidas y estreptoGraminas (Blair, et al., 2015 & Sosoranga, 2018).

También se encuentran enzimas, enfocadas en la modificación de la estructura química, como las enzimas modificadoras de aminoglucósidos codificadas en plásmidos; entre las principales enzimas se encuentran la acetil transferasa, fosfatidiltransferasa y adeniltransferasa. La acción principal de estas enzimas es inactivar al antibiótico, en este caso a un aminoglucósido y como consecuencia, éste no puede unirse a la subunidad 30S ribosomal y no interferirá en la síntesis de proteínas. Un ejemplo de lo citado se indica en la modificación del cloramfenicol por medio de una enzima intracelular, cloranfenicol acetiltransferasa, la cual acetila los dos grupos hidroxilo y previene la unión del cloranfenicol al ribosoma 50S (Blair, et al., 2015 & Sosoranga, 2018).

4.2.2. Alteración del sitio blanco del antibiótico.

Esta resistencia, es atribuida por la alteración o modificación del sitio blanco del antibiótico, actuando en algunos sitios específicos de la célula bacteriana, como la membrana celular, pared celular, subunidades ribosomales, entre otras. Estas modificaciones no permiten la unión del antibiótico con su sitio de acción y por lo tanto este, no desempeña su función dentro de la célula; un caso común se presenta en la modificación por mutación de los genes *GyrA* y *GyrB* que codifican para las topoisomerasas II y IV respectivamente, estos ofrecen resistencia bacteriana a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli* frente a las quinolonas. Otro ejemplo común es la metilación del RNA ribosomal de la subunidad 50S, la cual confiere resistencia a *S. aureus* y *S. epidermidis* frente

a tetraciclinas, cloranfenicol y macrólidos; de igual manera se ha determinado que *S. aureus* presenta alteración de las vías de metabolitos desarrollando resistencia a sulfonamidas por medio de un compuesto similar al ácido para-amino benzoico (PABA), el cual compite con las sulfonamidas por el sitio blanco (Blair, et al., 2015 & Troncoso, et al., 2017).

4.2.3. Alteraciones de las barreras de permeabilidad.

Este mecanismo, se genera por cambios a nivel de receptores bacterianos específicos para los antibióticos o por alteraciones estructurales en los componentes de la envoltura celular bacteriana como la membrana y pared celular, que influyen en la permeabilidad o en la pérdida de transporte activo, así como en la expresión de bombas de eflujo, las cuales se activan cuando el antibiótico ingresa a la célula. Desde esta perspectiva, se ha determinado dos mecanismos específicos:

Entrada disminuida: dentro de esta se encuentran, la permeabilidad de la membrana externa, la cual constituye una barrera intrínseca para la penetración del antibiótico; la permeabilidad de la membrana interna, la cual sugiere una modificación energética que compromete al transportador del antibiótico y por último las porinas (canales de difusión de la membrana externa) que presentan una modificación por mutación y por tal se genera una disminución de la entrada del antibiótico; un ejemplo de porinas en *E. coli* son las porinas, PhoeE, que seleccionan moléculas aniónicas OmpF y OmpC, que seleccionan moléculas catiónicas, estas se encuentran en mayor proporción en enterobacterias (Blair, et al., 2015 & Troncoso, et al., 2017).

Eflujo activo: el mecanismo se desarrolla, por la presencia de proteínas de membrana especializadas que alteran la producción de energía y además disminuyen la entrada del

antibiótico y generan la expulsión del mismo, mediante las denominadas bombas de eflujo. Estas bombas proveen resistencia a bacterias Gram positivas y Gram negativas y confieren resistencia a tetraciclinas, quinolonas, cloranfenicol, betalactámicos, así como a los antisépticos y desinfectantes de tipo amonio cuaternario utilizado para la limpieza de superficies; un ejemplo de esto es el gen *qepA* el cual, codifica para una bomba de eflujo tipo *QepA* que confiere resistencia a quinolonas como norfloxacin, ciprofloxacina y enrofloxacin (Álvarez, et al., 2015 & Blair, et al., 2015).

4.3. Bases genéticas de adquisición de resistencia

Las bacterias pueden adquirir mecanismos de resistencia mediante dos tipos de bases genéticas, la primera enfocada en la aparición de mutaciones y la segunda mediante la adquisición de genes de resistencia mediada por plásmidos, transposones e integrones (Martínez, 2006).

4.3.1. Mutación en un gen cromosómico

Las mutaciones genéticas son espontáneas y se generan de manera aleatoria, afectando a cualquier tipo de gen, estas mutaciones ocurren sin intervención de procedimientos mutagénicos experimentales. A nivel probabilístico este proceso puede ocurrir en cada gen en aproximadamente 1 de cada 10^8 microorganismos de una determinada población bacteriana. Cuando una población bacteriana es sometida a un determinado antibiótico, las bacterias sensibles tienden a inhibir su crecimiento y morir, no obstante, las bacterias que han sufrido alguna mutación que genere ventaja adaptativa sobrevivirán y con el tiempo reemplazarán a la población original; este hecho presenta gran relevancia debido a que se establece con claridad, que los antibióticos son un factor importante en la presión selectiva de bacterias con

diferentes mecanismos de resistencia. En la tabla 1, se indican ejemplos relevantes de resistencia codificadas por mutaciones bacterianas (Martínez, 2006).

Tabla 1. Ejemplos relevantes de resistencia codificada por mutaciones bacterianas

Antimicrobiano	Gen	Mecanismo
Rifampicina	<i>RpoB</i>	Alteración de la ARN polimerasa
Quinolonas	<i>gyrA, gyrB, parC, parE</i>	Alteraciones en las topoisomerasas
Varios	<i>AcrR</i>	Hiperexpresión de la bomba de expulsión <i>AcrAB</i>
β-lactámicos	<i>AmpD</i>	Hiperproducción de la β -lactamasa <i>AmpC</i>
Carbapenemicos	<i>OprD</i>	Pérdida de la porina específica para carbapenemicos

Varios: quinolonas, betalactámicos y carbapenemicos.

Fuente: (Martínez, 2006)

4.3.2. Transposones e integrones.

Los transposones no se pueden replicar por sí mismos, pero codifican una enzima denominada transposasa, la cual les permite transferirse entre diferentes elementos del

genoma bacteriano; es decir son genes saltarines que presentan la propiedad de movilizarse intermolecularmente. Algunos transposones son conjugativos (resistencia tetraciclinas y glucopéptidos) y pueden transferirse entre cromosomas de dos bacterias diferentes; por otra parte, los transposones no conjugativos (resistencia a macrólidos, glucopéptidos y aminoglucósidos) pueden integrarse en plásmidos y de esta manera diseminarse entre las poblaciones bacterianas (Alós, 2015 & Martínez, 2006).

Los integrones de mayor interés clínico son los de tipo 16, que constan de dos regiones constantes y una región variable. Las regiones constantes se localizan en los extremos 5' (que contienen una variante del gen *int*, que codifica una integrasa) y 3' (con un fragmento del gen *qacE1*, de resistencia a amonios cuaternarios, y el gen *sul1*, de resistencia a sulfamidas); además, se ha determinado genes *EMAs* que codifican para enzimas modificadoras de aminoglucósidos se encuentran dentro de integrones, con mayor frecuencia que otros determinantes genéticos de resistencia facilitando la diseminación de los mismos (Barba, et al., 2017 & Martínez, 2006).

La región variable entre las dos zonas constantes contiene uno o más genes de resistencia (habitualmente denominados *cassetes*). Los integrones pueden pasar de unas bacterias a otras formando parte de transposones o plásmidos (Barba, et al., 2017 & Martínez, 2006).

4.3.3. Plásmidos R de resistencia.

Los plásmidos son capaces de conferir a las bacterias que los adquieren resistencia a múltiples antibióticos simultáneamente, además tienen la capacidad de transferirse epidémicamente de modo horizontal, es decir, entre células distintas de la misma especie o

entre distintas especies. Están constituidos por módulos móviles llamados transposones, de modo que tienen flexibilidad para adquirir nuevos factores asociados a su virulencia a partir de otras especies; una forma de agrupar plásmidos es por su habilidad de transferirse de una bacteria a otra. Los plásmidos conjugativos contienen transgenes que realizan complejos procesos de conjugación, como la transferencia sexual de plásmidos a otra bacteria. Los plásmidos no-conjugativos, son incapaces de iniciar una conjugación, de allí que ellos pueden transferirse únicamente con la asistencia de los plásmidos conjugativos. Una clase intermedia son los plásmidos de movilización, los cuales llevan sólo un subtipo de genes requeridos para la transferencia (Orlek, et al, 2017).

Otra forma de clasificar plásmidos es por su función, hay 5 clases principales: los plásmidos de fertilidad, que contienen transgenes que son capaces de conjugarse; los plásmidos de resistencia, históricamente los plásmidos de resistencia son conocidos como factores R, antes de que se entendiera la naturaleza de los plásmidos, estos contienen genes que pueden constituir resistencia contra antibióticos o antimicrobianos (Tabla 2); los colplásmidos, contienen genes que determinan la producción de colinas y proteínas que pueden matar a otra bacteria; los plásmidos degradativos, habilitan la digestión de sustancias inusuales como tolueno o ácido salicílico y los plásmidos virulentos, convierten a la bacteria en un patógeno. Es necesario aclarar que los plásmidos pueden pertenecer a más de uno de estos grupos funcionales (Martínez, 2006 & Orlek, et al, 2017).

Tabla 2. Resistencia codificada por plásmidos

Antimicrobiano	Proteína	Mecanismo	Bacterias
β -lactámicos	β -lactamasas	Hidrólisis del antimicrobiano	Gram negativos, Gram positivos
Aminoglucósidos	Enzimas modificadoras	Acetilación, fosforilación, adenilación	Gram negativos, Gram positivos
Quinolonas	Familia Qnr	Protección de las topoisomerasas de clase II	Enterobacterias
Glucopéptidos	Múltiples (ligasa)	Alteración del peptidoglucano	<i>Enterococcus</i> spp.; otros Gram positivos
Macrólidos	Metilasas	Metilación del RNA ribosómico	Gram positivos

Fuente: (Martínez, 2006)

4.4. *E. coli* multirresistente

Es una bacteria Gram negativa cilíndrica con 1,1 – 1,5 μm de diámetro por 2,0 – 6,0 μm de largo que se dispone aislada o en parejas. Conforme a la definición general de la familia *Enterobacteriaceae* a la que pertenece, es una bacteria quimioheterótrofa facultativa teniendo metabolismo fermentativo y aeróbico, no forma esporas, negativa para prueba de oxidasa, produce catalasa y β -galactosidasa, puede ser móviles por flagelos peritricos o inmóvil y normalmente reduce nitrato a nitrito. El género *Escherichia* comprende cinco especies distintas, *E. coli*, *E. hermanni*, *E. fergusonii*, *E. vulneris* y *E. blattae*. La especie *E.*

coli es la única de importancia epidemiológica. No obstante, en algunos casos se reporta que *E. hermanii* y *E. vulneris* provocan infecciones en heridas (Morejon, 2013).

E. coli es un microorganismo facultativo que se puede encontrar en el tracto gastrointestinal de los animales de sangre caliente, aparece en pequeña proporción con relación al contenido total de bacterias en este sitio anatómico; por lo cual es utilizada como indicador de contaminación fecal. La Familia *Enterobacteriaceae* es parte de la microbiota animal y humana normal, encontrándose en el tracto gastrointestinal. Según Dufour (1984), la concentración de *E. coli* en heces de seres humanos varía de 10^6 - 10^9 microorganismos/g; sin embargo, las cepas de *E. coli*, han sido asociadas con infecciones severas en vías urinarias, septicemia, meningitis neonatal, síndrome urémico hemolítico y diarrea (Morejon, 2013).

Actualmente, esta especie bacteriana ha cobrado importancia, debido a que es una de las bacterias multirresistentes de mayor impacto a nivel hospitalario, esta presenta altos niveles de resistencia a antibióticos betalactámicos y supone grandes complicaciones en el tratamiento con antibióticos cuando son requeridos. Adicionalmente, la aparición de cepas de *E. coli* asociadas con enzimas BLEE, capaces de inactivar las oxiiiminocefalosporinas (ceftriaxona, cefotaxima y ceftazidima) y el aztreonam, han generado un panorama alarmante, ya que el desarrollo y diseminación de estas BLEE ha complejizado el tratamiento de algunas infecciones, como es el caso de la infecciones urinarias especialmente en pacientes hospitalizados con sondas prolongadas, multitratados con antibióticos, en particular, con cefalosporinas de tercera generación y fluoroquinolonas (Sachdeva, et al., 2017). El aumento en el desarrollo de la resistencia se debe principalmente a la adquisición de diferentes mecanismos moleculares, procesos mediados por mutaciones a nivel cromosómico o transferencia horizontal de genes entre bacterias de la misma o diferente especie; con relación

a esto, se ha descrito que *E. coli* presenta una amplia variedad de estos mecanismos, a través de los cuales, logra sobrevivir en presencia de una amplia gama de antibióticos (Sachdeva, et al., 2017).

4.4.1. Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli*.

Las enterobacterias a nivel mundial presentan alta resistencia hacia ampicilina (beta-lactámico), trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, cloranfenicol y ácido nalidíxico por lo que se debe determinar la prevalencia de los diferentes genes relacionados a nivel molecular (Sachdeva, et al., 2017); entre los mecanismos moleculares presentes en *E. coli* encontramos los siguientes:

4.4.2. Mecanismos contra antibióticos betalactámicos.

Uno de los mecanismos reportados contra antibióticos betalactámicos, se genera mediante enzimas hidrolíticas, denominadas betalactamasas, las cuales actúan en el enlace amida del núcleo betalactámico inhibiendo el efecto del antibiótico; estas actúan como sustratos competitivos de distintas enzimas participantes en la síntesis de membrana, esencialmente de las transpeptidasas denominadas proteínas fijadoras de penicilina (PBP), ya que presentan una similitud estructural con el extremo D-alanina-D-alanina del pentapéptido que enlaza las cadenas de N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina del peptidoglicano. Las betalactamasas pertenecen a una amplia familia, clasificadas dentro de grupos 1,2 y 3, en estos grupos se han caracterizado cerca de 890 betalactamasas; en este sentido las familias más comunes son: *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*OXA-1 y *bla*CARB. Respecto a cepas de *E. coli* se ha reportado una familia BLEE, de gran relevancia denominadas *bla*CTX-M, las cuales son resistentes a cefalosporinas de tercera generación; igualmente han sido descritas familias

como *bla*GES, resistente a ceftazidima; *bla*TEM y *bla*SHV resistentes, a penicilinas y por último *bla*OXA-1, resistente a cloxacilina (Mosquito, et al., 2011; Sachdeva, et al., 2017; Rada, Hernández-Gómez, Restrepo, & Villegas, 2019).

Recientemente, se centra la atención en las BLEE de *E. coli*, ya que son enzimas capaces de hidrolizar las penicilinas, cefalosporinas (menos las cefamicinas) y las monobactamasas, además se encuentran distribuidas a nivel mundial gracias a que los genes *bla*_{BLEE} están presentes en elementos móviles como los plásmidos conjugativos, asociados directamente a integrones, los que facilitan el intercambio horizontal de estos. Por lo tanto, es importante analizar la ubicación de los genes de resistencia en elementos móviles, con el fin de establecer una mejor previsión acerca de la expansión potencial de los mismos, no sólo de forma clonal, sino también entre distintas especies y géneros (García, et al., 2011; Sachdeva, et al., 2017; Rada, Hernández-Gómez, Restrepo, & Villegas, 2019).

4.4.3. Mecanismos contra quinolonas

Las quinolonas actúan inhibiendo la acción de las topoisomerasas tipo II, como la DNA girasa y topoisomerasa IV; la DNA girasa es una enzima compuesta por cuatro subunidades dos tipo A y dos tipo B codificadas por *GyrA* y *GyrB* respectivamente. Esta enzima es encargada de catalizar el superenrollamiento negativo del DNA y la topoisomerasa IV presenta cuatro subunidades codificadas por *parC* y *parE*, homólogas a *GyrA* y *GyrB*, correspondientemente. Entre los mecanismos moleculares de resistencia, se encuentran las alteraciones en los blancos de quinolonas, las bombas de expulsión activa y la transferencia de genes de resistencia plasmídicos (García, et al., 2011; Sachdeva, et al., 2017).

Reportes en cepas de *E. coli*, indican que la resistencia a fluoroquinolonas se encuentra ligada a mutaciones puntuales a nivel del gen *GyrA* (además de la posición 83 se afecta la posición 87) y *parC*. No obstante, otro tipo de mecanismos de resistencia a quinolonas está relacionado con la transferencia de genes mediante plásmidos, como es el caso de los genes *Qnr* que codifican a la familia de las proteínas Qnr (*QnrA*, *QnrB*, *QnrS*, *QnrC* y *QnrD*) que se unen a la DNA girasa (*GyrA* y *GyrB*) y a la topoisomerasa IV (*parC* y *parE*), disminuyendo la acción de las quinolonas (García, et al., 2011 & Sachdeva, et al., 2017).

4.4.4. Mecanismos contra tetraciclinas

Las tetraciclinas se unen a la parte 16S de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, de manera que inhibe la síntesis de proteínas al evitar la unión del aminoacil-tRNA en la posición A del ribosoma. El mecanismo de resistencia más común hacia este antibiótico es mediante sistemas de eflujo, en bacterias Gram negativas son codificados por los genes *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetI* y *tetY*, todos ellos previamente descritos en *E. coli*; sin embargo, existen otros mecanismos codificados por diferentes genes que le dan resistencia como protección ribosomal y acción enzimática sobre las tetraciclinas. Se ha reportado que los genes más frecuentes en cepas de *E. coli*, son los genes *tetA* y *tetB* (Ramos, 2016).

4.4.5. Mecanismos contra trimetropim – sulfametoxazol

Las sulfonamidas han sido extensamente empleadas en el ámbito médico humano y en animales, esto generó rápidamente una alta resistencia antibiótica, por ello se empezó a utilizar de manera combinada con diaminopirimidinas como es el caso del trimetropim. El mecanismo de acción de las sulfonamidas se basa en la inhibición de la síntesis de la

dihidropteroatosintasa, enzima clave en la ruta del ácido fólico. En el caso del trimetropim actúa inhibiendo la enzima dihidrofolatoreductasa (*dfr*), enzima importante en la síntesis de ácido fólico. Estos mecanismos se generan por la adquisición de genes mutantes mediante elementos móviles. En cuanto a las sulfonamidas, los genes implicados son *sul1*, *sul2* y *sul3* relacionados con integrones, en trimetropim, se han descritos múltiples genes *dfr* que generan resistencia antibiótica. Estudios previos realizados en Australia, indican que los genes más comunes asociados a cepas de *E coli* son *sul1*, *sul2* y *sul3*; así como de *dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA7*, *dfrA12* y *dfrA17*, genes principalmente relacionados con integrones tipo 1 y 2 (De la Tabla, et al., 2017).

4.4.6. Mecanismos contra cloranfenicol

El cloranfenicol actúa inhibiendo la elongación de la cadena de péptidos uniéndose de manera reversible al centro de la peptidiltransferasa del ribosoma; el mecanismo más frecuente para evadir dicho antibiótico se genera mediante la inactivación enzimática por acetilación mediante los diferentes tipos de cloranfenicol acetiltransferasas (CAT); adicionalmente, la resistencia a cloranfenicol puede estar mediada por sistemas de exportadores específicos para cloranfenicol y florfenicol (su derivado), relacionados con genes como *cmlA* y *floR* (30); en el caso de *E. coli* se ha descrito el gen *floR* asociado principalmente a plásmidos (Tabla 3) (Mosquito, et al., 2011).

Tabla 3. Mecanismos de resistencia a cloranfenicol descritos en *E. coli*

Grupo	Gen	Plásmido/transposon/ cromosoma	N.º acceso en base de datos
Cloramfenicol transferasas (CAT) tipo A			
A-1	<i>catI</i>	Tn9, 429	V00622
A-2	<i>catII</i>	pSa	X53796
Cloramfenicol transferasas (CAT) tipo B			
B-2	<i>catB2</i>	pNR79: Tn2424	AF047479
B-3	<i>catB3</i>	pHSH2	AY259086
Exportadores específicos para cloramfenicol/florfenicol			
E-1	<i>cmlA5</i>	R751 (Tn2000)	AF205943
E-2	<i>cml</i>	R26	M22614
E-3	<i>Flo</i>	Plasmid1	AF252855
<i>floR</i>		Plasmid1	AF231986
<i>floR</i>		pMBSF1	AJ518835

Fuente: (Martínez, 2006)

4.5 Modelos matemáticos

Los sistemas bacterianos se caracterizan por ser complejos y diversos, por lo tanto, pueden ser estudiados mediante diferentes modelos; estos se entienden como representaciones de sistemas dinámicos en el tiempo que pueden explicar los fenómenos observados. En este sentido, un modelo matemático se define como un conjunto de expresiones (ecuaciones o logaritmos) que describen teóricamente un objeto. Inicialmente para el modelamiento se formula la pregunta de investigación y se determinan las variables, parámetros y constantes a incluir (Volkova et al., 2013).

Los modelos basados en ecuaciones diferenciales ordinarias (EDO), permiten evaluar cómo se comporta un sistema con diferentes entidades individuales; en este modelo se admite que las condiciones y parámetros iniciales varíen, con el fin de evaluar el grado de incertidumbre de la trayectoria para llegar al resultado final (Pardilla, 2011). Estos modelos se han propuesto para describir la dinámica de bacterias resistentes respecto al contacto con plásmidos en medios líquidos, donde las bacterias están en contacto con las partículas plasmídicas e inicia el proceso de transferencia, en este modelo las tasas son proporcionales a la constante de reacción y al producto de las densidades de las especies que intervienen (Pardilla, 2011).

5. Estado del arte

La resistencia bacteriana a los antibióticos es considerada un problema a nivel mundial, por el aumento en la tasa de morbilidad y mortalidad en la población, desencadenada por infecciones de difícil tratamiento; varias investigaciones han enfocado sus esfuerzos a caracterizar especies bacterianas de alto impacto a nivel hospitalario y detectar genes para determinar su asociación con la resistencia a los antimicrobianos.

Estudios realizados por Blanc, Llagostera, & Cortes (2008), determinaron que cepas de la especie *E. coli* provenientes de granjas, presentaron resistencia marcada a antibióticos betalactámicos, asociada a la presencia de enzimas betalactamasas *bla*CTX-M-14 y cefamicinasas CMY-2; adicionalmente en la investigación se realizaron pruebas de transformación mediante conjugación, determinando que más de 70% de las cepas transfirieron por conjugación dichas resistencias. Paralelamente, Davis et al. (2010) evaluaron la presencia de genes de resistencia a aminoglucosidos en aislamientos de *E. coli* empleando

ensayos de susceptibilidad y microarreglos de DNA; de esta manera se demostró que once aislamientos fueron fenotípicamente resistentes a los a aminoglicosidos y se detectó en uno de ellos la presencia de un gen que codificaba para una proteína homóloga perteneciente a la familia de enzimas 16S RNAr metiltransferasas.

No obstante, Johnson et al. (2013), indicaron que la resistencia a las fluoroquinolonas en cepas de *E. coli* de origen diverso, se genera principalmente por un subclon de una mutación conservada en los genes *GyrA* y *parC*; de manera que la rápida expansión clonal de una sola cepa con dicha mutación es la principal fuente de la actual epidemia de resistencia a las fluoroquinolonas. Por otra parte, Petty et al. (2014) examinaron la epidemiología molecular mediante análisis filogenéticos de una colección de cepas de *E. coli* ST131 (clon multiresistente, diseminado globalmente) aisladas de seis lugares geográficos distintos en todo el mundo, estableciendo la identificación de tres sublineajes respecto a factores de virulencia y resistencia a fluoroquinolonas, pero con poca asociación en cuanto al origen geográfico; la mayoría de las variantes de un solo nucleótido asociadas con cada uno de los sublineajes se adjudicaron principalmente por la recombinación en regiones adyacentes por elementos genéticos móviles.

Consecutivamente, Rezai, et al. (2015) reportaron que 30,5% de aislados de *E. coli* de pacientes pediátricos en el norte de Irán eran productoras de BLEE y se encontraban asociadas con la presencia de genes de resistencia de tipo *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX y *bla*VEB, siendo el gen *bla*TEM el más frecuente en los aislamientos. Entre tanto, se determinó que estos aislados eran susceptibles a antibióticos carbapenémicos. De igual manera, Arce-Gil, et al. (2015) determinaron que 51,4% de cepas de *E. coli* aisladas de urocultivos de pacientes con infección urinaria en Perú, eran productoras de BLEE tipo

CTXM, asociado directamente con la presencia del gen *bla*CTX-M, lo que indicó que la resistencia a este tipo de antibióticos va en constante aumento.

Investigaciones realizadas por Alrowais, et al. (2015) evaluaron la resistencia a fosfomicina en cepas de *E. coli*, mediante pruebas de susceptibilidad y técnicas de PCR para la detección de genes específicos; se estableció que la cepa *E. coli* YD472 presentaba resistencia marcada a fosfomicina relacionada con la presencia de los genes *fosA3* y *fosC2*. Complementariamente, se comprobó que dichos genes se encontraban asociados con plásmidos, los cuales presentaban otro tipo de genes de resistencia como *bla* CTX-M-65, *bla* TEM-1 y *rmtB*. Recientemente, McGann, et al. (2016) indicaron la presencia de una cepa de *E. coli* MRSN 388634 resistente al antibiótico de último recurso, la colistina, además se estableció que esta resistencia estaba codificada por el gen *Mcr-1* presente en un plásmido que portaba siete genes adicionales de resistencia, generando un panorama alarmante.

Franco et al. (2016) identificaron a nivel molecular BLEE (*bla*TEM y *bla*SHV), en *E. coli* uropatógena aislada en pacientes ambulatorios de Santander, mediante la técnica Kirby-bauer y PCR; de esta manera se logró determinar que 52,8% de los aislados eran portadores del gen *bla*TEM, 2,8% del gen *bla*SHV-2 y 1,68% de ambos genes, concluyendo que principalmente el gen *bla*TEM se encontraba involucrado en la producción de este tipo de enzimas. Finalmente, Blanco et al. (2016) realizaron un estudio de casos en instituciones de salud de tercer nivel en Colombia, con el fin de identificar aislados de *E. coli* productores de BLEE, empleando pruebas de susceptibilidad a antibióticos y PCR en tiempo real; de esta forma lograron establecer que la mayoría de los aislados presentaban genes involucrados con resistencia (*bla*CTX-M-15) y se encontraban asociados con infecciones urinarias.

Diferentes tipos de modelos matemáticos han sido desarrollados para explicar una variedad de características relativas a la transmisión de resistencia a antibióticos, Volkova et al. (2012) desarrollaron un modelo matemático para comprender la dinámica de la resistencia mediada por plásmidos al antibiótico de tipo cefalosporina *ceftiofur* en ganado. El modelo muestra que una fracción pequeña pero estable de *E. coli* resistente puede persistir en ausencia de presión inmediata de *ceftiofur*, sostenida por transferencia horizontal y vertical de plásmidos portadores de genes de resistencia.

Por otro lado, modelos matemáticos se han utilizado para optimizar el uso de antibióticos, es así como Obolski & Hadany (2012) desarrollan un modelo matemático donde se proponen predicciones para minimizar la resistencia a antibióticos en bacterias que dependen de estrategias de tratamientos. Además, algunos modelos han sido usados para diseñar medidas eficaces de control (Weinstein, et al. 2001). Volkova et al. (2013) generaron un modelo estocástico para investigar las fuentes y roles en la dinámica de resistencia, durante la terapia antimicrobiana y en su ausencia, este modelo muestra que la estocasticidad en los parámetros contribuye en la distribución de *E. coli* resistente.

Baker et al. (2016) modelaron la propagación de la resistencia a antibióticos en residuos agrícolas almacenados, concluyendo que la transferencia de genes y el suministro de antibióticos tienen una sutil influencia en la resistencia. Además, se evidencio que, si la tasa de transferencia de genes es alta, la resistencia aumenta y la entrada de antibióticos tiene poco impacto. Romero, et al. (2018) desarrollaron un modelo matemático sobre la influencia de los plásmidos en la propagación de la resistencia bacteriana a antibióticos, en este modelo se analizó la dinámica poblacional de bacterias sensibles y resistentes a múltiples antibióticos, dilucidando que se adquiere resistencia a los medicamentos a través de mutaciones y

transmisión de plásmidos; lo que genera tres posibilidades: eliminación de bacterias, persistencia de solo bacterias resistentes o coexistencia de bacterias sensibles y resistentes.

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Determinar la resistencia a antibióticos de la bacteria *E. coli* aislada de ambiente clínico de la ciudad de San Juan de Pasto.

6.2. Objetivos específicos

Caracterizar los aislados de *E. coli* provenientes de ambiente clínico de la ciudad de San Juan de Pasto.

Identificar los genes vinculados a la resistencia a antibióticos de aislados de *E. coli*, provenientes de ambiente clínico.

Evaluar la tasa de transformación vía plasmídica de una población sensible a antibióticos.

Formular una aproximación de un modelo matemático que describa la tasa de transformación vía plasmídica de una población sensible a antibióticos.

Hipótesis

La resistencia a antibióticos de *E. coli* aislada de ambiente clínico en San Juan de Pasto, está asociada con la presencia de genes de resistencia y plásmidos.

7. Materiales y métodos

7.1. Consecución de aislados de *E. coli*

Los aislados bacterianos fueron proporcionados por el Laboratorio Clínico Especializado Ltda. de la ciudad de San Juan de Pasto, el cual brindó información respecto a: código, fuente, fecha de aislamiento, perfil de resistencia y en algunos casos edad y tipo de paciente. Posteriormente, se verificaron las condiciones axénicas de los aislados mediante tinción de Gram.

7.2. Caracterización Microbiológica

Se llevó a cabo la descripción de características macroscópicas de 32 aislados bacterianos, para esto, inicialmente se propagaron en cajas Petri con agar Eosin Methylene Blue (EMB) y posterior a su confirmación morfológica en el medio selectivo, se llevaron a agar Mueller Hinton (M.H) donde se incubaron por 18 h a 37 °C. En este medio se realizó la descripción de los atributos culturales: forma, margen, borde, elevación, superficie, textura, propiedad óptica, tamaño, configuración y color (Villota & Otero, 2009); consecuentemente, se realizó la descripción de características microscópicas mediante tinción de Gram. Para la identificación preliminar de los aislados, se determinaron las principales características bioquímicas empleando pruebas específicas para bacterias Gram negativas (*E. coli*), dichas pruebas fueron: Triple Sugar Iron Agar (TSI), Sulfide Índole Motility (SIM), indol, Citrato de Simmons (CS), oxidasa, Lisina Hierro Agar (LIA) y Voges-Proskauer (MR-VP) (Farmer, 1995).

Finalmente, se evaluó del perfil de resistencia a los antibióticos, para esto se empleó el método de Kirby-Bauer (método de difusión en agar), utilizando antibióticos

betalactámicos (ampicilina, amoxicilina, penicilina, cefotoxina y aztreonam), carbapenemicos (imipenem) aminoglicosidos (amikacina y gentamicina), fluoroquinolonas (ciprofloxacina), y trimetoprim/sulfametoxazol, siguiendo los lineamientos establecidos por *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (2018) (Davis, et al., 2010; Johnson, et al., 2010; & Rezai, et al., 2015). Una vez se confirmó la resistencia de los aislados de *E. coli*, se llevó a cabo la construcción de un banco de células primarias, para esto se inoculó 500 μ L de cada aislado previamente crecido en caldo y se colocaron en crioviales que contenían 500 μ L de glicerol a 60%, se homogenizó la mezcla, se realizó la prueba de viabilidad en tiempo cero y posteriormente fueron conservados a -20°C .

7.3. Caracterización molecular

7.3.1. Extracción de DNA Cromosomal.

Inicialmente, se inoculó una colonia de cada aislado en 10 mL de caldo Luria Bertani (LB) que fue incubado por 18 horas a 37°C ; transcurrido este tiempo se transfirió el cultivo a un tubo falcon de 15 mL y se centrifugó a 7800 rpm por 5 minutos, el pellet celular se trató con 567 μ L de solución tampón TE 1M, los tubos se conservaron en hielo y posteriormente, se adicionaron 30 μ L de SDS a 10% y 9 μ L de proteinasa K (Promega) en una concentración de 20 mg/mL, se homogenizó suavemente y se llevó a baño maría por 1 hora a 37°C . Una vez transcurrido este tiempo los tubos se colocaron nuevamente sobre hielo y se adicionaron 100 μ L de NaCl 5 M, se agitó con vortex y se agregaron 80 μ L de CTAB precalentado a 65°C , se mezcló vigorosamente y se llevó a baño maría por 20 minutos a 65°C . Transcurrido este tiempo se dejaron enfriar los tubos a temperatura ambiente y se agregó igual volumen de cloroformo-alcohol isoamilico (24:1), la mezcla se centrifugó a 10000 rpm por 25 minutos. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se agregó 1 μ L de RNAsa (10 mg/mL) (Promega), se

incubo por 1 hora a 37 °C. Después de este tiempo se adicionó igual volumen de cloroformo, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 10000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se precipitó el DNA con 0,6 volúmenes de alcohol isopropílico frío, homogenizando el tubo lentamente por inversión. Se centrifugó nuevamente a 10000 rpm por 5 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y el pellet se secó a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió el DNA en 50 µL de agua milli-Q (Burbano- Rosero, et al.,2017).

Para verificar la integridad del DNA se corrieron geles de agarosa a 1% tratados con Ez visión (AMRESCO) y usando como marcadores de tamaño molecular *lambda Hind III* y *1 Kb* (Promega), las condiciones de corrida fueron 70 V por 90 minutos (*Multisub Electrophoresis System Cleaver Scientific*). El gel fue visualizado en un sistema de fotodocumentación *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. La concentración de DNA se verificó mediante *NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer with Wi-Fi*.

7.3.2. Extracción de DNA plasmídico.

Se llevó a cabo el proceso de extracción de DNA plasmídico de los aislados bacterianos con el kit comercial *PureYield™ Plasmid Miniprep System* (Promega) siguiendo las condiciones del fabricante; para verificar la integridad del DNA plasmídico se prepararon geles de agarosa a 1,2% y se trataron con Gel Red (Biotium), como marcador de tamaño molecular se utilizó *1 Kb* (Promega) y las condiciones de corrida fueron 80V por 90 minutos. El gel fue visualizado en un sistema de fotodocumentación *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. Para evitar que los aislados bacterianos pierdan los plásmidos y conserven la mayoría de sus características se crioconservaron en glicerol 60% a – 20 °C.

7.3.2.1. Análisis del perfil plasmídico.

Se determinó el tamaño aproximado de cada una de las bandas generadas en el perfil plasmídico usando el programa PHOTOCAPTW. Posteriormente se realizó una matriz de presencia- ausencia y se construyó un dendrograma con el software NTSYS Spc 2.1 (Licencia UH3071IX) tomando los criterios *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean* (UPGMA).

7.3.3. Amplificación de genes vinculados a la resistencia a antibióticos de los aislados de *E. coli* en DNA cromosomal y plasmídico.

Con la finalidad de verificar la presencia de genes de resistencia en los aislados bacterianos, se realizó un proceso de amplificación de diferentes genes con primers citados en literatura (Tabla 4), teniendo en cuenta condiciones estandarizadas en el laboratorio (Tabla 5).

Tabla 4. *Primers para amplificación de genes de resistencia*

Genes	Primers	Autores
<i>blaCTX-M</i>	CTXM-1 (5'-TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA 3') CTX-M-2 (5'CGATATCGTTGGTGGTGCCAT 3')	(Arce-Gil ,et al., 2013)
<i>blaKPC</i> (Carbapenemasas)	KPC- F (5' CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG 3') KPC-R (5' CTTGTCATCCTTGTTAGGCG 3')	(Martínez, et al., 2016)
<i>blaCTX-M-2</i> (Cefotaxima)	CTX-M-2F (5' ATG ATG ACTCAG AGC ATT CG 3') CTX-M-2R (5' TTA TTG CAT CAG AAA CCG TG 3')	(Desimoni, et al., 2004)
<i>blaTEM</i> (BLEE)	TEM -1 (5'ATAAAATTCTTGAAGACGAAA 3') TEM- 2 (5'GACAGTTACCAATGCTTAATCA 3')	(González, et al., 2007)
<i>blaSHV</i> (BLEE)	SHV -1 (5'TCAGCGAAAAACACCTTG 3') SHV – 2 (5'TCCCGCAGATAAATCACCA 3')	(González, et al., 2007)
<i>blaSHV</i> (BLEE)	S H V - 1 (5' TGGTTATGCGTTATATTCGCC 3') S H V - 2 (5' GGTTAGCGTTGCCAGTGC 3')	(Gil, et al.,2014)
<i>blaKPC</i> (Carbapenemasas)	KPC-f-(5' CC GTCTAGTTCTGCTGTC 3') KPC-r (5' CGTTGTCA TCC TTGTTAG 3')	(Ho, et al., 2013)
<i>Mcr-1</i> (Colistina)	mcr-1-F (5' ATGATGCAGCATACTTCTGTG 3') mcr-1-R (5' TCAGCGGATGAATGCGGTG3')	(Ye, et al., 2016)
<i>FosA</i> (Fosfomicina)	fosA–F131 (5' ATCTGTGGGTCTGCCTGTCGT 3') fosA–R401 (5' ATGCCCCGCATAGGGCTTCT 3')	(Li, et al., 2015)

Tabla 5. Condiciones PCR para amplificación de genes de resistencia

Genes	Condiciones	Autores
<i>blaCTX-M</i>	94 °C 2 minutos 30 ciclos de 94 °C 30 segundos, 56 °C 1minuto, 72 °C 1 minuto y extensión final a 72 °C por 5 minutos.	(Este estudio)
<i>blaKPC</i> (Carbapenemasas)	94 °C 2 minutos 30 ciclos de 94 °C 30 segundos, 54 °C 1minuto, 72 °C 1 minuto y extensión final a 72 °C por 5 minutos.	(Este estudio)
<i>blaCTX-M-2</i> (Cefotaxima)	94 °C 2 minutos 30 ciclos de 94 °C 30 segundos, 54 °C 1minuto, 72 °C 1 minuto y extensión final a 72 °C por 5 minutos.	(Este estudio)
<i>blaTEM</i> (BLEE)	94 °C 2 minutos 30 ciclos de 94 °C 30 segundos, 50 °C 1minuto, 72 °C 1 minuto y extensión final a 72 °C por 5 minutos.	(Este estudio)
<i>blaSHV</i> (BLEE)	94 °C 2 minutos 30 ciclos de 94 °C 30 segundos, 52 °C 1minuto, 72 °C 1 minuto y extensión final a 72 °C por 5 minutos.	(Este estudio)
<i>blaSHV</i> (BLEE)	94 °C 2 minutos 30 ciclos de 94 °C 30 segundos, 52 °C 1minuto, 72 °C 1 minuto y extensión final a 72 °C por 5 minutos.	(Este estudio)
<i>blaKPC</i> (Carbapenemasas)	94 °C 2 minutos 30 ciclos de 94 °C 30 segundos, 54 °C 1minuto, 72 °C 1 minuto y extensión final a 72 °C por 5 minutos.	(Este estudio)
<i>Mcr-1</i> (Colistina)	94 °C 2 minutos 30 ciclos de 94 °C 30 segundos, 52 °C 1minuto, 72 °C 1 minuto y extensión final a 72 °C por 5 minutos.	(Este estudio)
<i>FosA</i> (Fosfomicina)	94 °C 2 minutos 30 ciclos de 94 °C 30 segundos, 56 °C 1minuto, 72 °C 1 minuto y extensión final a 72 °C por 5 minutos.	(Este estudio)

7.3.4. Amplificación de la subunidad 16S rRNA.

Para la amplificación se emplearon los primers 27F 5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3' (Weisburg, Barns, Pelletier, & Lane, 1991) y 1041R 5'(CGG TGT GTA CAA GAC CC 3' (Nübel, et al., 1996); Se trabajó a una concentración final de 0,4 µM de primers,

mix de dNTPs a 0,05 mM, Taq DNA Polimerasa 0,025 u/ μ L, MgCl 21 mM, 10 μ L de Buffer Colorless (Promega) y H₂O ultrapura 32,75 μ L; la reacción de PCR se realizó en un termociclador MULTIGENE Labnet, con el siguiente programa de termociclado: 95 °C por 2 minutos; 30 ciclos de: 94 °C por 2 minutos, 55 °C por 1 minuto y 72 °C por 3 minutos y una extensión final de 10 minutos a 72 °C. Las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa a 1% - TAE 1X, las condiciones de corrida fueron 70V por 1 hora y 30 minutos en una cámara de electroforesis *Multisub Electrophoresis System Cleaver Scientific* (Burbano- Rosero et al. 2017).

7.3.4.1. Secuenciación del gen 16S rRNA.

La calidad y concentración de las muestras se verificaron mediante comparación de intensidad de bandas respecto a las concentraciones estándar dadas por los fragmentos del marcador, las muestras se ajustaron teniendo en cuenta los requerimientos de la corporación Corpogen (contrato número:190301-1) donde fue llevada a cabo la secuenciación. Esta empresa basó su proceso de secuenciación en el método de Sanger, electroforesis capilar y un secuenciador *ABI PRISM® 3500 Analyzer* (8 capillary type).

7.3.4.2. Edición de secuencias.

Cada una de las secuencias forward del gen 16s RNAr fue visualizada y verificada en su totalidad en el programa *Chromas lite V. 2.01*; las secuencias fueron editadas (Tamura, et al., 2011) y alineadas (*Clustal W Multiple*) en el programa *BioEdit V. 7.0.4* (Burbano- Rosero, et al., 2017).

7.3.4.3. *Comparación con las bases de datos Ribosomal Database Project (RDP) y GenBank.*

Inicialmente, la comparación de las secuencias se realizó en la base de datos *Ribosomal Database Project* (RDP) (Fecha de acceso: 3 de junio de 2019). Se ingresó al link (<http://rdp.cme.msu.edu/>), posteriormente se seleccionó el icono *Classifier* y se cargó el archivo del alineamiento guardado en *BioEdit*, se seleccionó la opción *Submit*, y se obtuvo una identificación preliminar, se procedió a ingresar en el link *Seqmatch*, se cargó nuevamente las secuencias guardadas en *BioEdit* y se seleccionaron las opciones: *Strain (Both)*, *Source (Both)*, *Size (>1200)*, *Quality (Good)*, *Taxonomy (Nomenclatural)*, *KNN Matches (2)*. Una vez hecho esto se seleccionó la opción *Submit*. Finalmente, la opción *Show printer friendly results* para visualizar el resultado de acuerdo con el número de KNN Matches seleccionado.

Adicionalmente, se compararon las secuencias de estudio con la base de datos de *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Para ello, se ingresó al link (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), luego se seleccionó la opción BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) específicamente *nucleotide blast*; consecutivamente, se cargó las secuencias editadas en formato fasta, se seleccionó la opción *nucleotide collection (nr/nt)*, *Highly similar sequences (megablast)* y finalmente se aplicó la herramienta BLAST. Una vez obtenidos los resultados, se seleccionó el microorganismo que presentó mayor porcentaje de identidad y origen similar a las secuencias analizadas.

Posteriormente, se determinaron las relaciones filogenéticas entre las cepas, mediante la generación de un árbol filogenético; como método de reconstrucción se emplearon matrices

de distancia *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages* (UPGMA), en el programa Mega X 10.1 de libre acceso (fecha de ingreso: 3 de junio de 2019).

7.3.5. Amplificación de secuencias intergénicas de consenso repetitivas de enterobacterias (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR, ERIC-PCR*)

Para la amplificación se emplearon los primers ERIC 1R (5' TGTAAGCTCCTGGGGAT3') y ERIC 2 (5'AAGTAAGTGACTGGGGGTGAGC 3') (Adiguzel, et al., 2009). La reacción se ajustó a un volumen de 25 µL y una concentración final de 0,2 µM de primers, mix de dNTPs a 0,025 mM, Taq DNA Polimerasa 0,025 u/µL, MgCl 21 mM, 5 µL de Buffer Colorless (Promega) y H₂O ultrapura 16,373 µL. Las muestras se corrieron en un termociclador MULTIGENE Labnet, con el siguiente programa: 95 °C por 7 minutos; 30 ciclos de: 94 °C por 1 minuto, 52 °C por 1 minuto y 65 °C por 8 minutos y una extensión final de 15 minutos a 65 °C (Adiguzel, et al., 2009). Las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa a 1% - TAE 1X, las condiciones de corrida fueron 70 V por 90 minutos en una cámara de electroforesis *Multisub Electrophoresis System Cleaver Scientific*; consecutivamente se analizaron los polimorfismos en el software NTSYS Spc 2.1(Licencia UH3071IX).

7.4. Evaluación de la tasa de transformación vía plasmídica de una población de *E. coli* sensible a antibióticos

Para evaluar la tasa de transformación, se tuvo en cuenta los resultados obtenidos en el ítem 7.2 y 7.3 y se llevaron a cabo dos fases a nivel experimental en los cuales se incluyen análisis explicativo y predictivo (Figura 1 y 2).

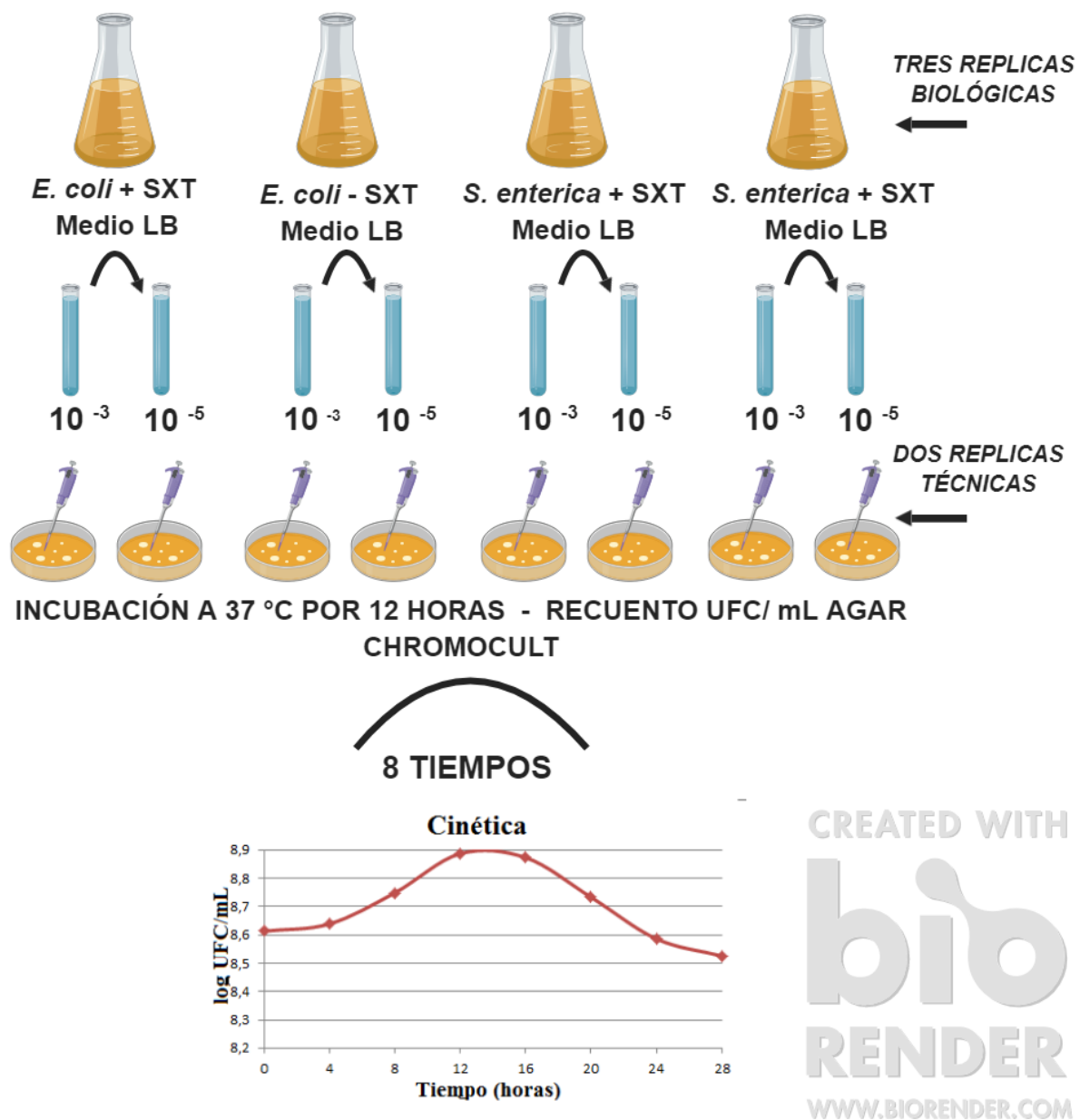


Figura 1. Diagrama experimental de cinética de crecimiento de *E. coli* y *S. enterica*.

Esta imagen fue creada empleada utilizando el programa BioRender de libre acceso.

Fuente este estudio

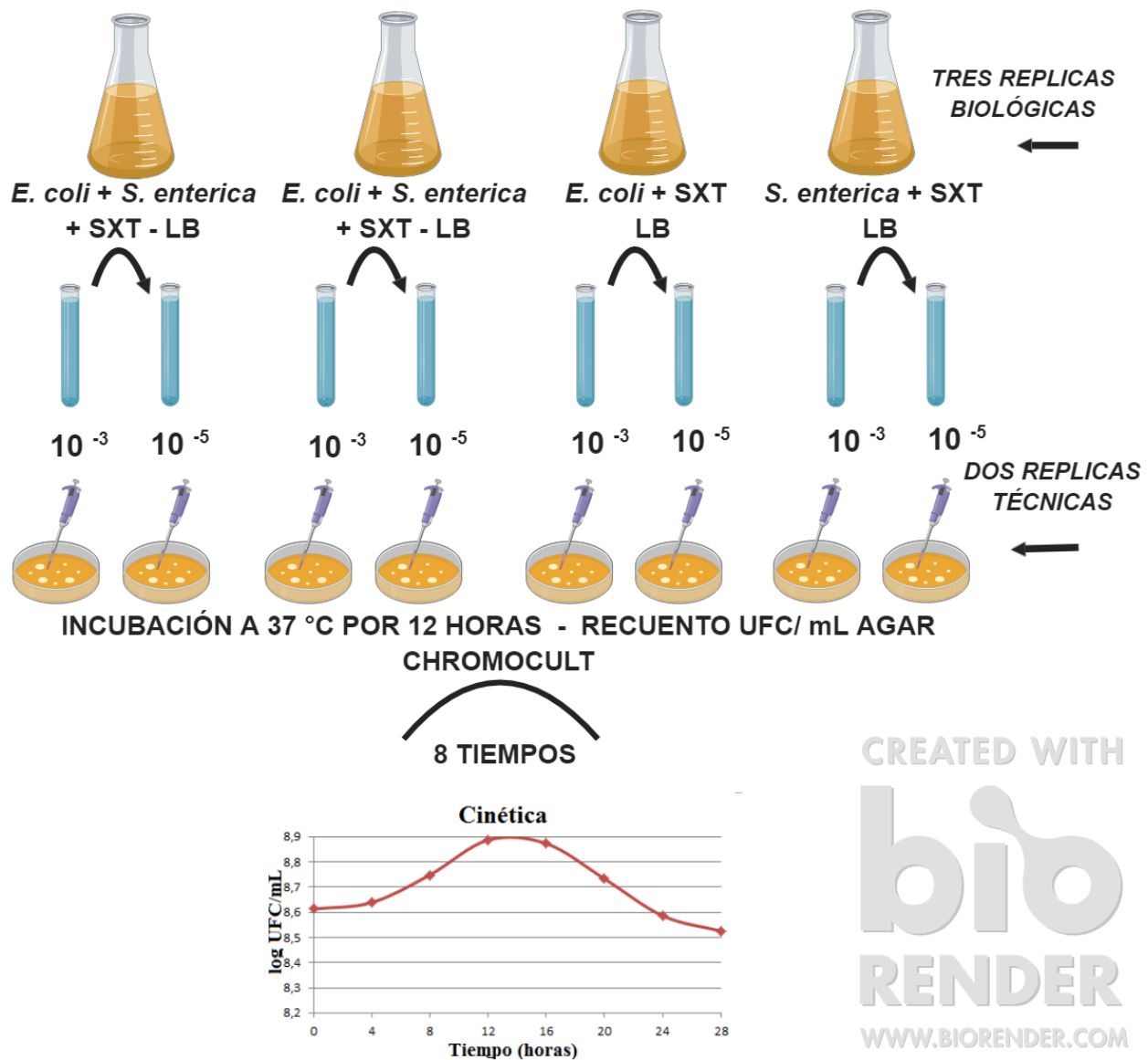


Figura 2. Diagrama experimental de transformación entre población resistente de *E. coli* y población sensible de *S. enterica*. Esta imagen fue creada empleando utilizando el programa Bio Render de libre acceso.

Fuente este estudio

7.4.1. Cinética de crecimiento.

Se realizó una cinética de crecimiento para el aislado 3 resistente a trimetropim-sulfametoxazol (SXT) y una cepa sensible *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC13076,

con el fin de determinar el comportamiento individual que presentan las poblaciones; cabe resaltar que este procedimiento tuvo en cuenta tres replicas biológicas y dos replicas técnicas. Las poblaciones bacterianas resistentes y sensibles, fueron inoculadas por separado en caldo LB suplementado con 0,2 mg/mL de SXT, como controles se tuvo en cuenta las poblaciones bacterianas resistentes y sensibles sin la presencia del antibiótico.

La medida de crecimiento poblacional se evaluó cada 4 horas durante 28 horas, para lo cual se emplearon inóculos iniciales de aproximadamente 10^8 bacterias sobre mililitro respecto al estándar de la escala Mc Farland. Para la cuantificación se empleó la técnica *spread plate* empleando 10 μ L de dos diluciones seriadas (10^{-3} y 10^{-5}) del inóculo final, los cuales se sembraron en cajas Petri con agar *Chromocult*; este agar fue empleado con la finalidad de diferenciar por coloración las colonias de *E. coli* (violeta) y *S. enterica* (blanca), basándose en que *E. coli* presenta la capacidad de metabolizar los sustratos X-glucurónido por la β -D-glucuronidasa y Salmon-GAL por la β -D-galactosidasa, generando colonias que adquieren un color entre azul oscuro y violeta en el medio. Las cajas se incubaron a 37°C por 12 horas (Calderón, et al., 2003). Para reportar el valor final en UFC/mL se empleó la ecuación:

$$\text{UFC /mL} = \frac{\text{Colonias en placa} * \text{factor de dilución}}{10 \mu\text{L (factor de siembra)}}$$

(Lyimo, et al., 2016)

7.4.2. Transformación vía plasmídica.

Para evaluar la tasa de transformación vía plasmídica, se trabajó con las poblaciones sensibles y resistentes mencionadas en el ítem 7.4.1, teniendo en cuenta los perfiles plasmídicos y genes de resistencia. Posteriormente se realizó la confrontación de la población bacteriana sensible, frente a la resistente portadora del gen de resistencia a SXT; para esto se emplearon inóculos de aproximadamente 10^8 bacterias sobre mililitro respecto al estándar de la escala Mc Farland, las dos poblaciones fueron inoculadas (proporción 1:1) en un caldo LB suplementado con 0,2 mg/mL de SXT, como controles se tuvo en cuenta las poblaciones bacterianas resistentes y sensibles por separado con la presencia del antibiótico.

Finalmente, para determinar el número de bacterias que adquirieron los mecanismos de resistencia (bacterias transformadas), se empleó la técnica *spread plate*, empleando 10 μ L de dos diluciones seriadas (10^{-3} y 10^{-5}) del inóculo final, los cuales se sembraron en cajas Petri con agar *Chromocult*. Las cajas se incubaron a 37°C por 12 horas; transcurrido este tiempo se realizó el recuento de colonias. Todo el proceso se llevó a cabo cada 4 horas durante 10 tiempos, teniendo en cuenta tres replicas biológicas y dos técnicas; para reportar el valor final en UFC/mL y la frecuencia de transformación (FT), se emplearon las siguientes ecuaciones:

$$\text{UFC mL} = \frac{\text{Colonias en placa} * \text{factor de dilución}}{10 \mu\text{L (factor de siembra)}}$$

$$\text{FT} = \frac{\text{UFC Transformantes}}{\text{UFC celulas donadoras al momento de la transformación}}$$

(Lyimo, et al., 2016)

Además, se verifico la transferencia de plásmidos, mediante extracción de DNA plasmídico, utilizando el kit comercial *PureYield™ Plasmid Miniprep System* (Promega) de la

colonia transformada y de cada uno de los tratamientos al finalizar el experimento. Para verificar la integridad del DNA plasmídico se prepararon geles de agarosa a 1,2%, como marcador de tamaño molecular se utilizó *1 Kb* (Promega), las condiciones de corrida fueron 80 V por 90 minutos. El gel fue visualizado en un sistema de fotodocumentación *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm.

7.5. Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados obtenidos en las diferentes cinéticas de crecimiento de la bacteria *E. coli* y del proceso de transformación, se empleó el Software Statgraphis Centurion XVI y se realizó un Modelo Lineal General (MLG) con el fin de determinar si existen diferencias significativas en el crecimiento respecto a la cepa bacteriana (*S. entérica* sensible y *E. coli* resistente). También se desarrolló un análisis de correlación de Spearman con el fin de establecer el grado de asociación entre el crecimiento de la población bacteriana resistente y sensible.

7.6. Aproximación a la dinámica de transformación mediante modelado matemático

7.6.1. Identificación de variables y parámetros.

A partir de los resultados experimentales y los fundamentos biológicos establecidos en la fase anterior, se determinaron los factores más importantes que intervienen tanto en la cinética de crecimiento como en la tasa de transformación de las poblaciones bacterianas. Lo anterior permitió identificar los parámetros y variables necesarios para realizar el modelamiento matemático (Burden & Douglas Faires, 1985). Las principales variables

matemáticas tanto para la cinética como para la transformación fueron las poblaciones de bacterias *S. enterica* sensible y *E. coli* resistente, sustrato M.H, antibiótico SXT y número de copias del plásmido de resistencia. Entre los parámetros matemáticos a considerar en la cinética de crecimiento se encuentran: tasa de crecimiento de las bacterias, parámetros de ajuste, tasas de muerte natural, tasa de eliminación bacteriana por acción del antibiótico, tasa de degradación de antibiótico, tasa de inhibición del crecimiento por acción del antibiótico y tasa de degradación de sustrato (Ibargüen-Mondragón, et al., 2014).

Los parámetros matemáticos para la transformación son: tasa de crecimiento de las bacterias, parámetros de ajuste, tasas de muerte natural, tasa de eliminación bacteriana por acción del antibiótico, tasa de transformación vía plasmídica, tasa de degradación de antibiótico, tasa de replicación del plásmido, tasa de degradación del plásmido, número de copias promedio del plásmido y tasa de degradación de sustrato.

7.6.2. Formulación de los modelos matemáticos.

Para la cinética de crecimiento se basó en un modelo logístico: En este modelo se tomó en cuenta un aspecto muy relevante para el crecimiento celular, este es la limitación de recursos. El modelo describió el crecimiento poblacional en un medio con recursos limitados, dicha limitación ejerce una restricción en el número de individuos sustentables (Murray, 2003). En este sentido la variación de la población es proporcional a la población por una función que depende de P , lo anterior implica la ecuación (1).

$$\frac{dP}{dt} = \alpha P f(P), (1)$$

donde α es la constante de proporcionalidad. A partir de la ecuación (1) se obtiene la siguiente ecuación

$$\frac{dP}{dt} = k P f(P) \quad (2)$$

La ecuación (2) tiene en cuenta la densidad de la población. Supongamos que existe una capacidad de carga N , luego esta capacidad de carga admite un número de individuos P , así se tiene: $P \leq N$. Sea $f(P) = \left(1 - \frac{P}{N}\right)$, sustituyendo en (2) la ecuación anterior se obtiene:

$$\frac{dP}{dt} = kP \left(1 - \frac{P}{N}\right)$$

Para la formulación de los modelos se tuvo en cuenta una capacidad de carga variable; puesto que el fenómeno biológico indicó que a medida que disminuye el sustrato, disminuye la cantidad de bacterias que puede soportar el mismo.

7.6.2.1. *Modelo matemático de la cinética de S. enterica sensible sin antibiótico.*

Basados en los experimentos de cinética del ítem 7.4.1 se formuló un modelo matemático que describió el crecimiento de *S. enterica* sensible en un medio con sustrato M.H. Para este fin se denotó la población de *S. enterica* sensible por Bs , la tasa de crecimiento por K_1^s el parámetro de ajuste del modelo por α_1 , entendido como la frecuencia de consumo de sustrato por unidad de tiempo, la tasa de muerte natural por μ_1^s y la capacidad de carga variable por S , siendo S el sustrato. La variación del sustrato en el tiempo es proporcional al producto entre S y Bs , con tasa de degradación del sustrato k_2 . A partir de lo anterior se obtienen las siguientes ecuaciones:

$$\frac{dBs}{dt} = K_1^s \left(1 - \alpha_1 \left(\frac{Bs}{S}\right)\right) Bs - \mu_1^s Bs \quad (1)$$

$$\frac{dS}{dt} = -d_1^s S B s \quad (2)$$

7.6.2.2. *Modelo matemático de la cinética de E. coli resistente sin antibiótico.*

Para la población bacteriana resistente se estableció un modelo similar siendo **Br** la población de bacterias resistentes, además la tasa de muerte natural se consideró como constante a partir de datos referenciados en literatura (Santos , Ferrat, & Eichelmann, 2005). Las ecuaciones del modelo fueron dadas por:

$$\frac{dBr}{dt} = K_1^e \left(1 - \alpha_2 \left(\frac{Br}{S} \right) \right) Br - \mu_1^e Br \quad (3)$$

$$\frac{dS}{dt} = -d_2^s S Br \quad (4)$$

7.6.2.3. *Modelo matemático de la cinética de S. enterica sensible con antibiótico.*

El modelo para la población sensible en presencia del antibiótico se estableció bajo la hipótesis que el antibiótico ejerció una presión de selección en la población bacteriana, lo que generó la expresión de mecanismos de resistencia y por ende el desarrollo de una población de bacterias resistentes.

La población de *S. enterica* sensible se denotó por **Bs**, la población de *S. enterica* resistente se denotó por **Br**, la concentración de antibiótico se denotó por **A** y el sustrato por **S**. De este modo se definió la presencia de una población sensible y resistente, con sus respectivas tasas de crecimiento K_2^s y K_1^r y tasas de muerte natural bacteriana μ_2^s y μ_1^r , parámetro de ajuste α_2 , tasa de eliminación bacteriana debido a la acción del antibiótico β_1 y tasa de transformación de bacterias sensibles debido al contacto con el antibiótico θ_1 .

Además, se incluyó la variación del sustrato y el antibiótico, basándose en la tasa de degradación de los mismos d_3^S y d_1^A , respectivamente, debido a la interacción con la población bacteriana. Cabe resaltar que la concentración inicial del antibiótico en el medio fue de 0,2 mg/ mL.

Las ecuaciones del modelo fueron dadas por:

$$\frac{dBs}{dt} = K_2^s \left(1 - \alpha_2 \left(\frac{Bs + Br}{S} \right) \right) Bs - \mu_2^s Bs - \theta_1 ABs - \beta_1 ABs \quad (5)$$

$$\frac{dBr}{dt} = K_1^r \left(1 - \alpha_2 \left(\frac{Bs + Br}{S} \right) \right) Br - \mu_1^r Br - \theta_1 ABs + \beta_1 ABs \quad (6)$$

$$\frac{dA}{dt} = -d_1^A A(Bs + Br) \quad (7)$$

$$\frac{dS}{dt} = -d_3^S S(Bs + Br) \quad (8)$$

7.6.2.4. *Modelo matemático de la cinética de E. coli resistente con antibiótico.*

Finalmente, para la población de bacterias resistentes en presencia del antibiótico se desarrolló un modelo similar a los anteriores. La población de *E. coli* sensible se denotó por Br , la concentración de antibiótico se denotó por A y el sustrato por S . Considerando la tasa de crecimiento por K_2^e , el parámetro de ajuste del modelo por α_3 , la tasa de muerte natural por μ_2^e , la tasa de inhibición del crecimiento debido a la acción del antibiótico por θ_2 y las tasas de degradación de sustrato y antibiótico por d_4^S y d_2^A , respectivamente. De igual manera se tuvo en cuenta una concentración inicial de antibiótico de 0,2 mg/ mL y únicamente una población de bacterias resistentes. La ecuación del modelo se referenció en:

$$\frac{dB_r}{dt} = K_2^e \left(1 - \alpha_3 \left(\frac{B_r}{S} \right) \right) B_r - \theta_2 A B_r - \mu_2^e B_r \quad (9)$$

$$\frac{dA}{dt} = -d_2^A A B_r \quad (10)$$

$$\frac{dS}{dt} = -d_4^S S B_r \quad (11)$$

7.6.2.5. Modelo matemático para transformación vía plasmídica de una población de *S. enterica* sensible en presencia de una población de *E. coli* resistente.

A partir de los experimentos biológicos desarrollados en el ítem 7.4.2 se formuló un modelo matemático que describió el proceso de transformación resultante de la interacción entre las poblaciones de *S. enterica* sensible y de *E. coli* resistente en presencia de antibiótico.

Para la transformación bacteriana se formularon dos modelos matemáticos (sistemas de ecuaciones diferenciales ordinarias), en el primer modelo, con la finalidad de generar una aproximación real del fenómeno biológico y un ajuste óptimo del modelo, se representó la dinámica antes del proceso de transformación y en el segundo durante dicho proceso.

El primer modelo matemático describe la dinámica en el rango comprendido entre las 0 y 28 horas, tiempo en el cual no es evidente el proceso de transformación y, por lo tanto, en el medio existen las poblaciones bacterianas de *S. enterica* sensible S_s y *E. coli* resistente E_r , además de los plásmidos, P , que se replican en el interior de *E. coli* resistente. También se supuso que el sustrato, S , está compuesto de nutrientes y antibiótico, A .

Los parámetros del modelo son: K_3^S y K_3^E , las tasas de crecimiento de *S. enterica* sensible y *E. coli* resistente, respectivamente, α_4 es el parámetro de ajuste, μ_3^S y μ_3^E son las tasas de muerte natural de *S. enterica* sensible y *E. coli* resistente,

correspondientemente, β_2 es la tasa de muerte por acción del antibiótico, ϵ_s y ϵ_r son las tasas de consumo de sustrato por *S. enterica* sensible y *E. coli* resistente, de forma correspondiente, n_1 es la tasa de replicación del plásmido dentro de la bacteria *E. coli*, μ_1^p es tasa de degradación del plásmido y M_1 representa la proporción de nutrientes del sustrato, lo cual implica que $1-M_1$ es la proporción de antibiótico en el sustrato.

A partir de lo anterior se obtuvo el siguiente modelo:

$$\frac{dE_r}{dt} = K_3^e E_r \left(1 - \alpha_4 \frac{S_s + E_r}{S}\right) - \mu_3^e E_r \quad (1)$$

$$\frac{dS_s}{dt} = K_3^s S_s \left(1 - \alpha_4 \frac{S_s + E_r}{S}\right) - \gamma_1 P S_s - \beta_2 A S_s - \mu_3^s S_s \quad (2)$$

$$\frac{dP}{dt} = n_1 E_r - \mu_1^p P \quad (3)$$

$$\frac{dS}{dt} = -M_1 (\epsilon_s S_s + \epsilon_r E_r) S \quad (4)$$

$$\frac{dA}{dt} = -(1 - M_1) (\epsilon_s S_s + \epsilon_r E_r) A \quad (5)$$

Para la formulación de la segunda fase, es decir, cuando sucede el proceso de transformación se desarrolló un modelo similar al anterior, en el cual la población de *S. enterica* sensible se transforma vía plasmídica en *S. enterica* resistente. Con base en lo anterior, se obtuvo el siguiente modelo:

$$\frac{dE_r}{dt} = K_4^e E_r \left(1 - \alpha_5 \frac{S_r + E_r}{S}\right) - \mu_3^e E_r \quad (1)$$

$$\frac{dS_r}{dt} = K_2^r S_r \left(1 - \alpha_5 \frac{S_r + E_r}{S}\right) + \gamma_2 P S_s - \mu_2^r S_r \quad (2)$$

$$\frac{dP}{dt} = n_2 E_r + m S_r - \mu_2^p P \quad (3)$$

$$\frac{dS}{dt} = -M_2 (\varepsilon_s S_s + \varepsilon_r E_r) S \quad (4)$$

$$\frac{dA}{dt} = -(1 - M_2) (\varepsilon_s S_s + \varepsilon_r E_r) A \quad (5)$$

Donde K_2^r es la tasa de crecimiento de *S. enterica* resistente, α_5 es el parámetro de ajuste, γ_2 es la tasa de transformación, μ_2^r es la tasa de muerte natural de *S. enterica* resistente, M_2 y n_2 son las tasas de replicación del plásmido en *E. coli* resistente y *S. enterica* resistente, respectivamente. También se tuvo en cuenta valores iniciales experimentales para las variables, sustrato (89,45 mg/mL), antibiótico (7,06 mg/mL) y plásmido (17,41 copias), tomadas del primer modelo.

7.6.3. Simulación numérica y análisis de resultados

En esta fase con datos obtenidos a partir de los experimentos biológicos en los ítems 7.4.1 y 7.4.2, se realizaron simulaciones numéricas mediante el uso del software MATLAB versión 2015a (Licencia: 1081117). Tanto para la cinética de crecimiento como para el proceso de transformación vía plasmídica, se estimaron los valores de los parámetros por medio del método de algoritmo genético. Lo anterior permitió ajustar las simulaciones numéricas del modelo a los datos experimentales y predecir el comportamiento en el tiempo de los fenómenos biológicos mencionados anteriormente.

En la estimación de parámetros se formuló la función a partir de la suma de mínimos cuadrados, se ajustaron simultáneamente a las ecuaciones del modelo doce conjuntos de datos experimentales obtenidos en cada una de las respectivas replicas biológicas y técnicas durante

el periodo de observación. Se empleó el promedio de cada una de las réplicas biológicas para realizar la estimación, con el fin de obtener rangos para cada uno de los parámetros y generar una estimación más cercana al fenómeno biológico. Complementariamente, se realizó una estimación de la población bacteriana a las 72 horas (periodo de vida de *E. coli* reportado en literatura), mediante un código de MATLAB estimado parámetros establecidos con anterioridad (Burden & Faires, 1985; Volkova, et al., 2013).

Debido a que el número de datos no permitió la convergencia de los once parámetros establecidos, para la transformación se tomaron algunos parámetros como valores fijos, los cuales fueron estimados mediante el modelado de la cinética.

8. Resultados y discusión

8.1. Consecución de los aislados de *E. coli*

A partir de las muestras de orina se obtuvo un total de 32 aislados; en el anexo 1 se indican las características de origen de cada una de los aislados.

8.2. Caracterización Microbiológica

Se determinaron las características microscópicas y macroscópicas de 32 aislados bacterianos de *E. coli*, los cuales según su morfológica microscópica corresponden en su totalidad a bacilos Gram negativos; de igual manera, se resalta una uniformidad en los atributos culturales de los aislados bacterianos exceptuando pequeñas diferencias en el tamaño de las colonias. La descripción morfológica de los aislados es importante, ya que es uno de los primeros niveles de identificación y clasificación de los microorganismos; sin embargo, se debe tener en cuenta que algunos de los atributos morfológicos pueden variar dependiendo del medio y las condiciones de cultivo, por lo tanto, es esencial que este tipo de procesos se lleven

a cabo bajo condiciones controladas asegurando la reproducibilidad de los resultados (Figura 3 y 4; Tabla 6) (Gutiérrez-Jiménez, et al., 2015 & Porres & Ruiz , 2018).

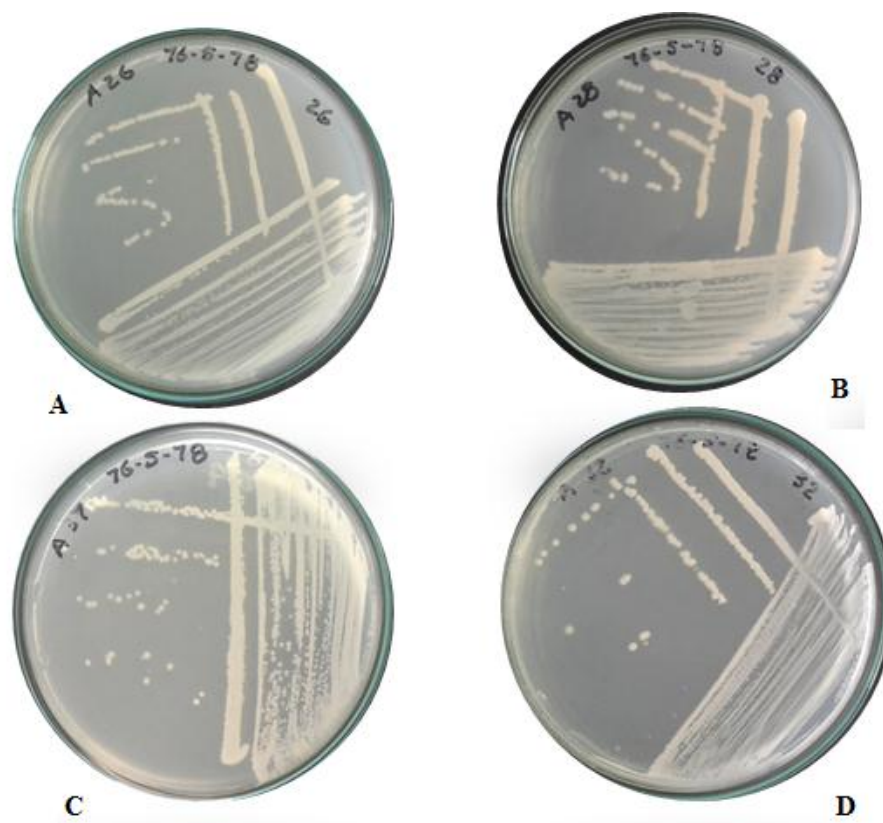


Figura 3. Características macroscópicas de los aislados de *E. coli*. A. Aislado 26 MN094135. B. Aislado 28 MN094137. C. Aislado 31 MN121155. D. Aislado 32 MN121156. La imagen indica características uniformes entre los diferentes aislados.

Fuente: este estudio

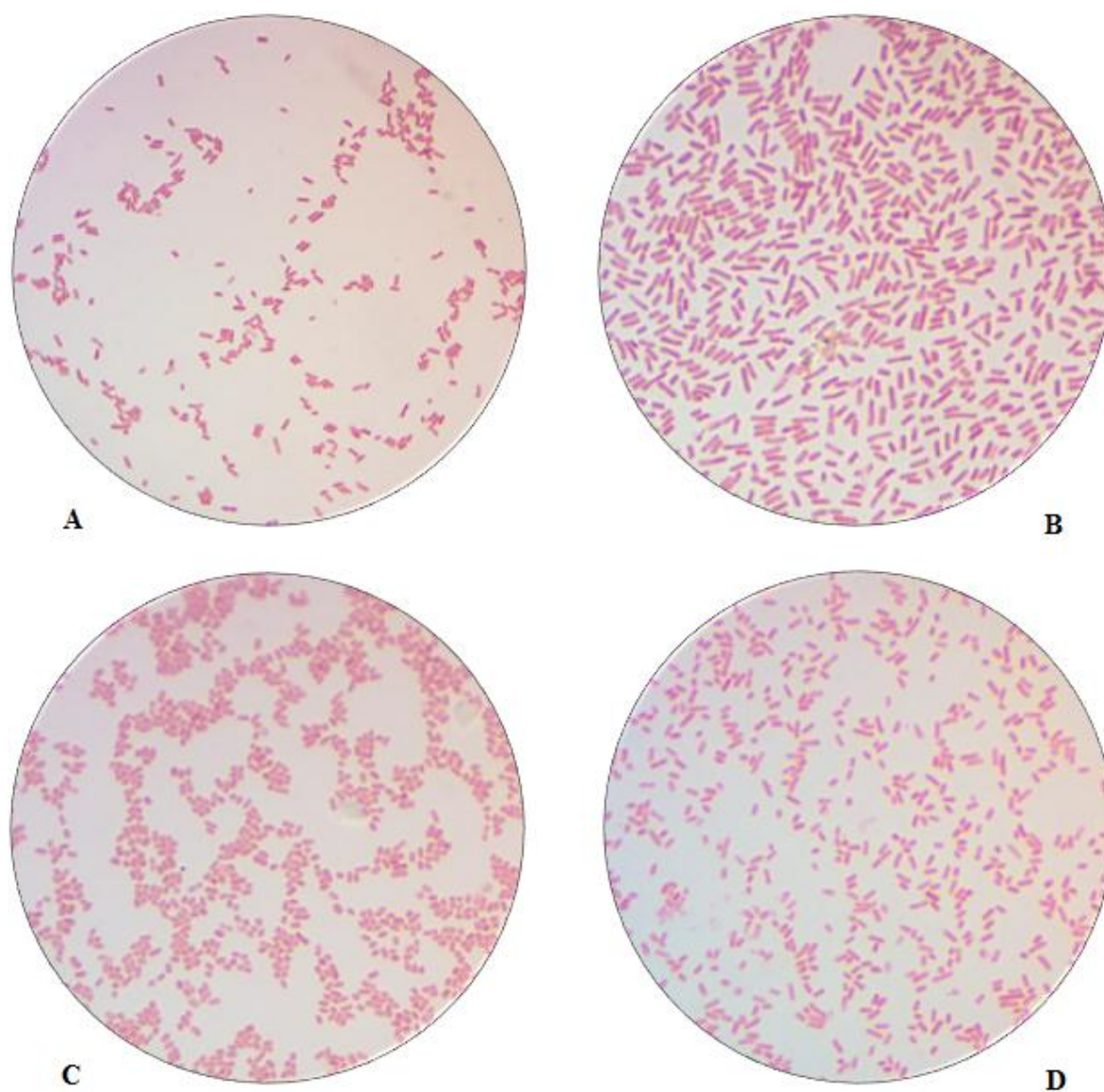


Figura 4. Coloración de Gram de los aislados de *E. coli*. En las imágenes se observa algunos de los aislados bacterianos provenientes de muestras de orina, los cuales presentan una morfología bacilar. A. Aislado 1 MN094112. B. Aislado 5 MN094115. C. Aislado 11 MN094120. D. Aislado16 MN094125. Aumento real observado 1000X.

Fuente: este estudio

Tabla 6. Descripción de las características macroscópicas y microscópicas de los aislados bacterianos de *E. coli*

Atributos culturales	Forma	Margen	Elevación	Superficie	Textura	Propiedad óptica	Tamaño	Configuración	Color	Morfología	Coloración	Agrupación
Aislado 1 MN094112	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Brillante	Pequeña	Redonda	Blanca	Bacilos	Gram negativos	Diplobacilos
Aislado 3 MN094113	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Brillante	Mediana	Redonda	Blanca	Bacilos	Gram negativos	Empalizada
Aislado 4 MN094114	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Brillante	Mediana	Redonda	Blanca	Bacilos	Gram negativos	Empalizada
Aislado 5 MN094115	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Brillante	Pequeña	Redonda	Blanca	Bacilos	Gram negativos	Diplobacilos
Aislado 6 MN094116	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Brillante	Pequeña	Redonda	Blanca	Bacilos	Gram negativos	Empalizada
Aislado 7 MN121153	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Brillante	Mediana	Redonda	Blanca	Bacilos	Gram negativos	Empalizada
Aislado 8 MN094117	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Brillante	Pequeña	Redonda	Blanca	Bacilos	Gram negativos	Empalizada
Aislado 9 MN094118	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Brillante	Pequeña	Redonda	Blanca	Bacilos	Gram negativos	Empalizada
Aislado 10 MN094119	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Brillante	Pequeña	Redonda	Blanca	Bacilos	Gram negativos	Empalizada
Aislado 11 MN094120	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Brillante	Pequeña	Redonda	Blanca	Bacilos	Gram negativos	Empalizada
Aislado 12 MN094121	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Brillante	Pequeña	Redonda	Blanca	Bacilos	Gram negativos	Empalizada
Aislado 13 MN094122	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Brillante	Pequeña	Redonda	Blanca	Bacilos	Gram negativos	Empalizada
Aislado 14 MN094123	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Brillante	Mediana	Redonda	Blanca	Bacilos	Gram negativos	Empalizada
Aislado 15 MN094124	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Brillante	Grande	Redonda	Blanca	Bacilos	Gram negativos	Empalizada
Aislado 16 MN094125	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Brillante	Pequeña	Redonda	Blanca	Bacilos	Gram negativos	Empalizada
Aislado 17 MN094126	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Brillante	Pequeña	Redonda	Blanca	Bacilos	Gram negativos	Empalizada
Aislado 18 MN094127	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Brillante	Mediana	Redonda	Blanca	Bacilos	Gram negativos	Empalizada
Aislado 19 MN094128	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Brillante	Mediana	Redonda	Blanca	Bacilos	Gram negativos	Empalizada
Aislado 20 MN094129	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Brillante	Pequeña	Redonda	Blanca	Bacilos	Gram negativos	Empalizada

Tabla 6. Descripción de las características macroscópicas y microscópicas de los aislados bacterianos de *E. coli*

Atributos culturales	Forma	Margen	Elevación	Superficie	Textura	Propiedad óptica	Tamaño	Configuración	Color	Morfología	Coloración	Agrupación
Aislado 21 MN094130	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Creмоса	Brillante	Pequeña	Redonda	Blanca	Bacilos	Gram negativos	Empalizada
Aislado 22 MN094131	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Creмоса	Brillante	Pequeña	Redonda	Blanca	Bacilos	Gram negativos	Empalizada
Aislado 23 MN094132	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Creмоса	Brillante	Pequeña	Redonda	Blanca	Bacilos	Gram negativos	Empalizada
Aislado 24 MN094133	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Creмоса	Brillante	Pequeña	Redonda	Blanca	Bacilos	Gram negativos	Empalizada
Aislado 25 MN094134	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Creмоса	Brillante	Pequeña	Redonda	Blanca	Bacilos	Gram negativos	Empalizada
Aislado 26 MN094135	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Creмоса	Brillante	Mediana	Redonda	Blanca	Bacilos	Gram negativos	Streptobacilos
Aislado 27 MN094136	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Creмоса	Brillante	Pequeña	Redonda	Blanca	Bacilos	Gram negativos	Empalizada
Aislado 28 MN094137	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Creмоса	Brillante	Pequeña	Redonda	Blanca	Bacilos	Gram negativos	Empalizada
Aislado 29 MN121154	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Creмоса	Brillante	Pequeña	Redonda	Blanca	Bacilos	Gram negativos	Empalizada
Aislado 30 MN094138	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Creмоса	Brillante	Pequeña	Redonda	Blanca	Bacilos	Gram negativos	Empalizada
Aislado 31 MN121155	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Creмоса	Brillante	Mediana	Redonda	Blanca	Bacilos	Gram negativos	Empalizada
Aislado 32 MN121156	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Creмоса	Brillante	Mediana	Redonda	Blanca	Bacilos	Gram negativos	Empalizada
Aislado 33 MN121157	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Creмоса	Brillante	Mediana	Redonda	Blanca	Bacilos	Gram negativos	Empalizada

Fuente: este estudio

La mayoría de los aislados bacterianos exhibieron características bioquímicas similares presentando una respuesta positiva para la producción de indol, ácidos láctico, fórmico y succínico, producción de gas, fermentación de glucosa, lactosa, sacarosa y movilidad. Una respuesta negativa para la producción de DI-acetil, citocromo oxidasa, ácido sulfhídrico, uso de citrato como única fuente de carbono y descarboxilación de lisina (Figura 5 y Tabla 7). No obstante los aislados 3, 7, 8, 10 y 15, presentaron variaciones en las pruebas de indol y producción de gas, esto posiblemente se debe, a que a las bacterias presentan mecanismos de modificación de la expresión génica dependiendo de las necesidades y ambiente en el que se encuentren, generando así la activación o represión de la síntesis de productos de ciertos genes, lo que generalmente se ve reflejado en las variaciones a nivel fenotípico (Betancor, Gadea, & Flores, 2014; Bustos, Rubio, & Navarro, 2017). Teniendo como referencia la caracterización microbiológica y las características propias de la especie *E. coli*, reportadas en el manual *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (1994), se establece que los 32 aislados presuntivamente pertenecen a esta especie.

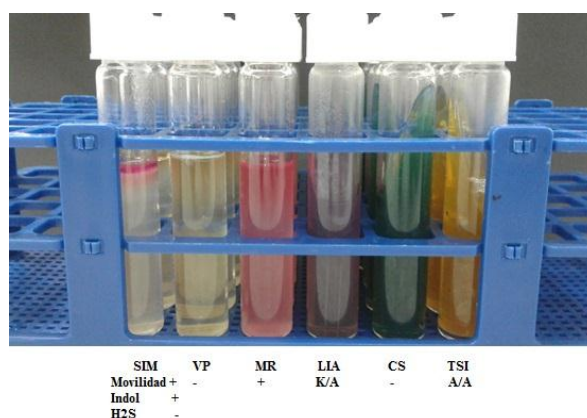


Figura 5. Pruebas bioquímicas realizadas para los aislados de *E. coli*. En la imagen se observa los resultados de las pruebas para el aislado 26 MN094135.

Fuente: este estudio

Tabla 7. Características bioquímicas de los aislados bacterianos de *E. coli*

Aislado	Fermentación (TSI)	Producción de gas	Motilidad	Producción de indol	Rojo de Metilo	Voges- Proskauer	Agar lisina y hierro (LIA)	Citrato de Simmons	Oxidasa	Producción de ácido sulfhídrico
Aislado 1 MN094112	A/A	P	P	P	P	N	K/A	N	N	N
Aislado 3 MN094113	A/A	N	P	N	P	N	K/A	N	N	N
Aislado 4 MN094114	A/A	P	P	P	P	N	K/A	N	N	N
Aislado 5 MN094115	A/A	P	P	P	P	N	K/A	N	N	N
Aislado 6 MN094116	A/A	P	P	P	P	N	K/A	N	N	N
Aislado 7 MN121153	A/A	P	P	N	P	N	K/A	N	N	N
Aislado 8 MN094117	A/A	P	P	P	P	N	K/A	N	N	N
Aislado 9 MN094118	A/A	P	P	N	P	N	K/A	N	N	N
Aislado 10 MN094119	A/A	N	P	P	P	N	K/A	N	N	N
Aislado 11 MN094120	A/A	P	P	P	P	N	K/A	N	N	N
Aislado 12 MN094121	A/A	P	P	P	P	N	K/A	N	N	N
Aislado 13 MN094122	A/A	P	P	P	P	N	K/A	N	N	N
Aislado 14 MN094123	A/A	P	P	P	P	N	K/A	N	N	N
Aislado 15 MN094124	A/A	P	P	N	P	N	K/A	N	N	N
Aislado 16 MN094125	A/A	P	P	P	P	N	K/A	N	N	N
Aislado 17 MN094126	A/A	P	P	P	P	N	K/A	N	N	N
Aislado 18 MN094127	A/A	P	P	P	P	N	K/A	N	N	N
Aislado 19 MN094128	A/A	P	P	P	P	N	K/A	N	N	N
Aislado 20 MN094129	A/A	P	P	P	P	N	K/A	N	N	N

Tabla 7. Características bioquímicas de los aislados bacterianos de *E. coli*

Aislado	Fermentación (TSI)	Producción de gas	Motilidad	Producción de indol	Rojo de Metilo	Voges- Proskauer	Agar lisina y hierro (LIA)	Citrato de Simmons	Oxidasa	Producción de ácido sulfhídrico
Aislado 21 MN094130	A/A	P	P	P	P	N	K/A	N	N	N
Aislado 22 MN094131	A/A	P	P	P	P	N	K/A	N	N	N
Aislado 23 MN094132	A/A	P	P	P	P	N	K/A	N	N	N
Aislado 24 MN094133	A/A	P	P	P	P	N	K/A	N	N	N
Aislado 25 MN094134	A/A	P	P	P	P	N	K/A	N	N	N
Aislado 26 MN094135	A/A	P	P	P	P	N	K/A	N	N	N
Aislado 27 MN094136	A/A	N	P	N	P	N	K/A	N	N	N
Aislado 28 MN094137	A/A	P	P	P	P	N	A	N	N	N
Aislado 29 MN121154	A/A	N	P	P	P	N	K/A	N	N	N
Aislado 30 MN094138	A/A	P	P	P	P	N	K/A	N	N	N
Aislado 31 MN121155	A/A	N	P	P	P	N	A	N	N	N
Aislado 32 MN121156	A/A	P	P	P	P	N	K/A	N	N	N
Aislado 33 MN121157	A/A	P	P	P	P	N	K/A	N	N	N

TSI: Agar-hierro-triple azúcar; P: positivo; N: negativo; A/A: fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa; K/A y A: no existe descarboxilación y desaminación de lisina.

Fuente: este estudio

8.2.1. Perfil de resistencia

Los aislados de *E. coli* presentaron el siguiente perfil de resistencia, penicilina (100%), trimetropim-sulfametoxazol (65,6%), ciprofloxacina (62,5%), amoxicilina (56,2%), ampicilina (50%), gentamicina (43,1%), aztreonam (28,1%), amikacina (25%), cefotoxime (18,7%) e imipenem (0%). El 71,8% de los aislados eran resistentes a más de tres antibióticos y 62,5 % eran resistentes a 3 o más grupos de antibióticos (Figura 6, 7 y Tabla 8). Los resultados obtenidos pueden compararse con lo reportado por Hernández-Gómez et al. (2014) quienes describieron la evolución de resistencia bacteriana en 23 hospitales de Colombia, determinando que *E. coli* presentaba un perfil de resistencia mayor para ciprofloxacina (31,7-34,5%), seguida de cefotoxime (15,1 y 16,9 %) y un mayor grado de sensibilidad para Imipenem (0,1-0,4%).

Rodríguez (2018) indicó que entre los años 2014 y 2015 en el hospital universitario metropolitano de Barranquilla, *E. coli* presentó una resistencia a antibióticos como la ampicilina (72,7 %) y trimetropim-sulfametoxazol (50%). Igualmente, Ibañez, Rojas, Sánchez, Fernández, & Madarriaga (2018), informaron que en el hospital de San José (Bogotá), se generaron patrones similares de resistencia en *E. coli* para ampicilina (55,7 %) y quinolonas (40%). Alviz-Amador, Gamero-Tafur, Caraballo-Marimon & Gamero-Tafur (2018), indicaron que, en el Hospital Universitario del Caribe en Cartagena, *E. coli* tenía un perfil de resistencia a ampicilina sulbactam (57,8%), trimetoprim-sulfametoxazol (51,7%) y ciprofloxacina (34,2%).

En contraste, Nocua-Báez et al. (2017) determinaron que en nueve hospitales de Colombia todas las muestras de *E. coli* aisladas del tracto urinario de pacientes diabéticos y de mujeres gestantes, exhibieron resistencia a amikacina e imipenem; reportes similares fueron descritos por Jiménez-Guerra, et al. (2018) en Granada- España. Por otra parte, Yábar et al. (2017) refieren, que cepas de *E. coli* provenientes de ambientes hospitalarios en Lima Perú, expresaron resistencia marcada a antibióticos como, trimetropim-sulfametoxazol, ampicilina y ciprofloxacina y patrones de sensibilidad a amikacina y carbapenemicos, de igual manera Luna-Pineda et al. (2018) señalaron que cepas de *E. coli* aisladas niños con infecciones urinarias exhibían patrones similares de multirresistencia.

Teniendo en cuenta los estudios descritos anteriormente tanto en el ámbito colombiano como en otros países, se puede inferir que los resultados obtenidos en este estudio concuerdan parcialmente con algunos de ellos; sin embargo, existen perfiles de resistencia propios de cada una de las zonas evaluadas, debido al ambiente en el que se desarrollan estos microorganismos. Según Bryce et al. (2016) & Angles (2018) los principales factores para el desarrollo de resistencia son la exposición prolongada a antibióticos y la administración de los mismos, sin prescripción médica, lo cual genera diferencias en la prevalencia de resistencia según la regulación de medicamentos en diferentes partes del mundo. No obstante, Rada , Hernández-Gómez, Restrepo, y Villegas (2019) señalaron que Colombia no difiere significativamente de las tendencias mundiales y se está convirtiendo en un país endémico de enzimas carbapenemasas con alto grado de diseminación por medio de elementos móviles como plásmidos.

Adicionalmente, se deduce que los altos porcentajes de resistencia antibióticos betalactámicos y quinolonas, se debe a que son tratamientos de primera línea para contrarrestar infecciones del tracto urinario causadas por *E. coli*; sin desconocer el papel que juega la automedicación y prescripción innecesaria de este tipo de antibióticos, lo que se convierte en presión de selección para cepas multirresistentes (Grados, Thuissard, & Alós, 2018).

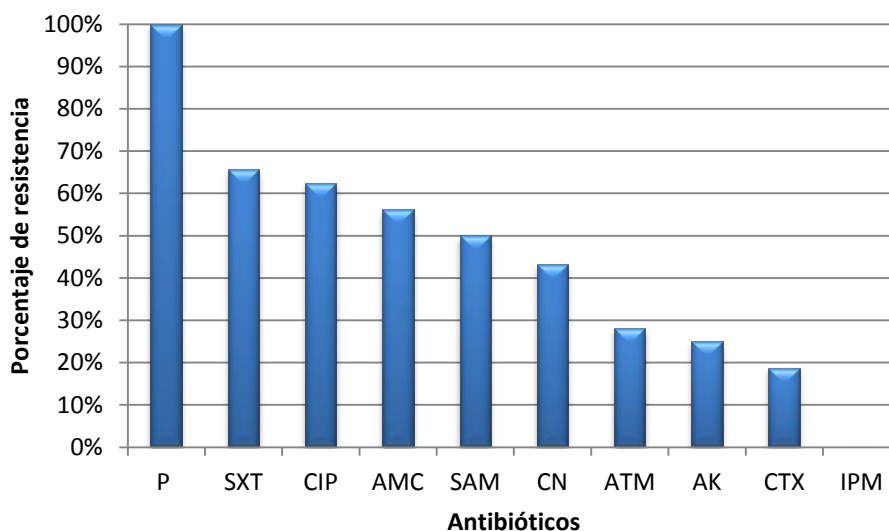


Figura 6. Perfil de resistencia de los aislados bacterianos de *E. coli*. P: penicilina; SAM: ampicilina; AMC: amoxicilina; CTX: cefotoxime; SXT: trimetropim- sulfametoxazol; CN: gentamicina; ATM: aztreonam; CIP: ciprofloxacina; IPM: imipenem; AK: amikacina.

Fuente: este estudio

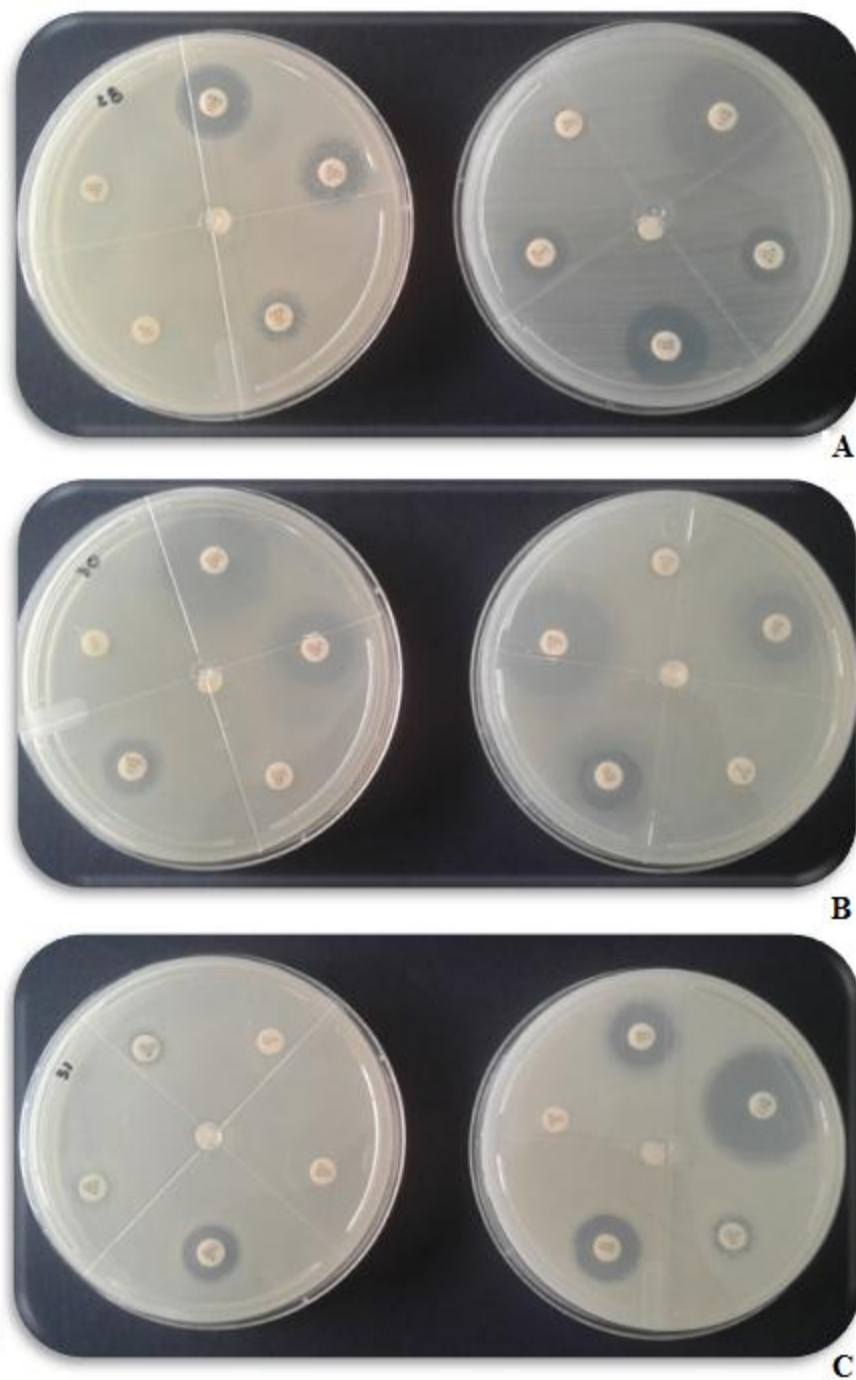


Figura 7. Perfil de resistencia a antibióticos (betalactámicos, carbapenémicos, aminoglucosidos, fluoroquinolonas, fosfonatos y trimetoprim/sulfametoxazol) de aislados de *E. coli*. A. Aislado 28 MN094137. B. Aislado 30 MN094138. C. Aislado 31 MN121155.

Fuente: este estudio

Tabla 8. Perfil de resistencia de aislados de *E. coli* a antibióticos.

Aislado	P	SAM	AMC	CTX	SXT	CN	ATM	CIP	IPM	AK
Aislado 1 MN094112	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R
Aislado 3 MN094113	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R
Aislado 4 MN094114	R	R	S	R	R	R	R	S	I	R
Aislado 5 MN094115	R	S	I	S	R	R	S	I	S	R
Aislado 6 MN094116	R	S	I	S	S	I	S	R	I	I
Aislado 7 MN121153	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
Aislado 8 MN094117	R	R	I	S	S	S	R	S	S	R
Aislado 9 MN094118	R	R	R	S	S	I	S	S	S	S
Aislado 10 MN094119	R	R	I	S	R	R	S	R	I	S
Aislado 11 MN094120	R	R	S	S	R	S	S	R	S	R
Aislado 12 MN094121	R	R	I	S	R	I	S	R	S	R
Aislado 13 MN094122	R	R	I	S	S	R	S	S	S	I
Aislado 14 MN094123	R	R	R	S	S	R	S	R	S	I
Aislado 15 MN094124	R	R	R	I	R	R	R	R	I	I
Aislado 16 MN094125	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S
Aislado 17 MN094126	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S
Aislado 18 MN094127	R	I	R	S	I	S	S	R	S	S
Aislado 19 MN094128	R	I	R	S	R	R	S	R	I	S
Aislado 20 MN094129	R	R	I	S	R	S	S	R	S	S
Aislado 21 MN094130	R	I	I	S	S	S	S	S	S	S
Aislado 22 MN094131	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S
Aislado 23 MN094132	R	I	R	S	R	S	S	R	S	S
Aislado 24 MN094133	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S
Aislado 25 MN094134	R	R	I	S	R	R	S	S	S	S
Aislado 26 MN094135	R	S	R	S	R	S	S	R	S	I
Aislado 27 MN094136	R	S	I	R	R	S	R	R	S	S
Aislado 28 MN094137	R	S	R	I	R	R	R	R	S	S
Aislado 29 MN121154	R	I	R	S	R	R	S	S	S	S
Aislado 30 MN094138	R	I	R	R	S	I	R	R	S	I
Aislado 31 MN121155	R	R	R	R	R	S	R	R	S	I
Aislado 32 MN121156	R	I	R	S	R	S	S	S	S	I
Aislado 33 MN121157	R	S	R	S	S	R	S	R	S	S

P: penicilina; SAM: ampicilina; AMC: amoxicilina; CTX: cefotaxime; SXT: trimetropim-sulfametoxazol; CN: gentamicina; ATM: aztreonam; CIP: ciprofloxacina; IPM: imipenem; AK: amikacina; R: resistente; I: intermedio y S: sensible.

Fuente: este estudio

8.3. Caracterización molecular

8.3.1. Extracción de DNA Cromosomal.

Las muestras de DNA presentaron buena calidad ((Chávez-Jacobo, Ramírez-Díaz, Silva-Sánchez, & Cervantes, 2017) y concentración (mayor o igual a 100 ng/μL) adecuadas para posteriores procedimientos moleculares (Sambrook, Fritschi & Maniatis, 1989) (Figura 8).

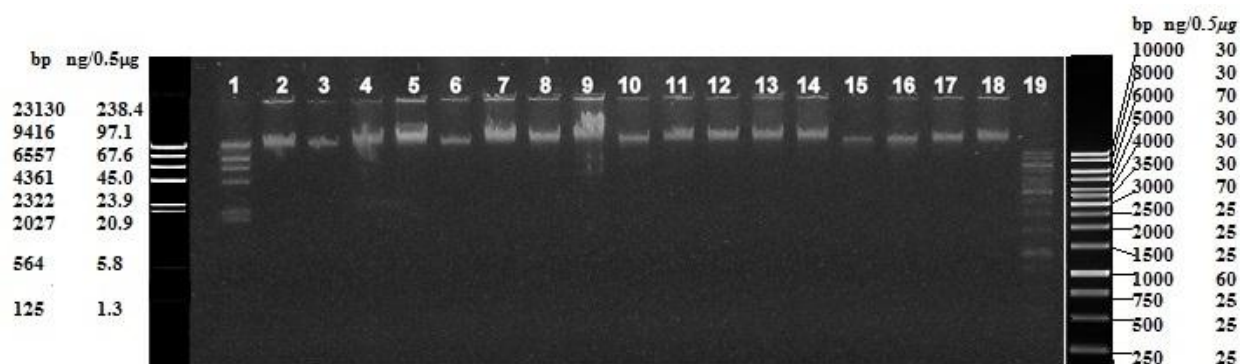


Figura 8. Verificación de extracción de DNA cromosomal. Gel de agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora, tratado con intercalante Ez Visión (AMRESCO) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el primero y en el último de los carriles se observan los marcadores moleculares *Lambda Hind III* y *1Kb* (Promega), respectivamente; en los carriles 2 a 18, se encuentran los aislados 1 a 18 de *E. coli*.

Fuente: este estudio

8.3.2. Extracción de DNA plasmídico y análisis de perfiles

De los 32 aislados bacterianos de *E. coli*, 16 exhibieron plásmidos con un perfil de uno a cinco bandas por muestra y tamaños aproximados entre 0,9 y 18,7 Kb; los plásmidos más comunes dentro de las muestras fueron de 10,7 y 1,0 Kb, únicamente dos muestras presentaron plásmidos mayores a 16 Kb (Figura 9 y 10 y Tabla 9). El análisis de similaridad respecto a la presencia de plásmidos, indicó que la mayoría de los aislados presentaron un porcentaje mayor o igual a 50%; además se resalta que los aislados 26 y 20 muestran un porcentaje de similaridad de 80% (Figura 11), ya que comparten dos plásmidos de 10,7 y 1,0 Kb, esto concuerda con la resistencia de los aislados a antibióticos como amoxicilina, penicilina y trimetoprim-sulfametoxazol.

En el dendrograma se distingue la formación de cuatro subclusters particulares con porcentajes de similaridad mayor de 50%, esto se vincula directamente con la presencia de plásmidos característicos y comunes en cada uno de los grupos. El subcluster I presenta un plásmido con un tamaño de 10,7 Kb y fenotípicamente resistencia a penicilina; subcluster II tiene dos plásmidos de 10,7 y 1,3 Kb, con resistencia a penicilina, amoxicilina y ciprofloxacina; subcluster III dos plásmidos de 10,7 y 5,5 Kb con resistencia a penicilina, trimetoprim-sulfametoxazol y ciprofloxacina; por último, el subcluster IV evidencia un plásmido de 1,0 Kb y resistencia a penicilina, trimetoprim - sulfametoxazol, ciprofloxacina y aztreonam. Teniendo en cuenta lo mencionado con anterioridad se dedujo que estos plásmidos se encuentran asociados con la resistencia a antibióticos y que probablemente el plásmido con

tamaño aproximado de 10,7 Kb sea el responsable de la resistencia a penicilina, ya que se encuentra en tres de los cuatro subclusters con dicha resistencia (Vignoli & Seija, 2007).

Al respecto, Chávez-Jacobo, Ramírez-Díaz, Silva-Sánchez & Cervantes (2017) reportan que los plásmidos pHSH10-2, pHPA y pOLA52 presentes en *E. coli* de origen clínico, confieren resistencia a quinolonas como la ciprofloxacina; Díaz et al. (2015) & Argente et al. (2019) indican, que genes que codifican para BLEE, se encuentran en plásmidos conjugativos con tamaño variable (7 a 160 Kb) y suelen presentar una frecuencia de transferencia que varía desde 10^{-7} a 10^{-2} por célula donadora.

McGann et al. (2016) identificaron una cepa de *E. coli* que presentaba 15 genes de resistencia para antibióticos betalactámicos, carbapenémicos, fosfonatos entre otros, alojados en dos plásmidos pMR0516mcr y pMR0416ctx con tamaños superiores a 47 Kb; de igual manera, Jamborova et al. (2017) determinaron diferentes clones de *E. coli* con resistencia a múltiples a antibióticos como quinolonas y cefalosporinas, asociados con genes de resistencia, los cuales se encontraron en 14 plásmidos con tamaño variable (3 a 200Kb). Por lo tanto, se infiere que posiblemente los plásmidos reportados en este estudio pueden presentar genes asociados con resistencia a los antibióticos empleados; no obstante, es necesario complementar la información obtenida con otros análisis moleculares para la detección de los genes.

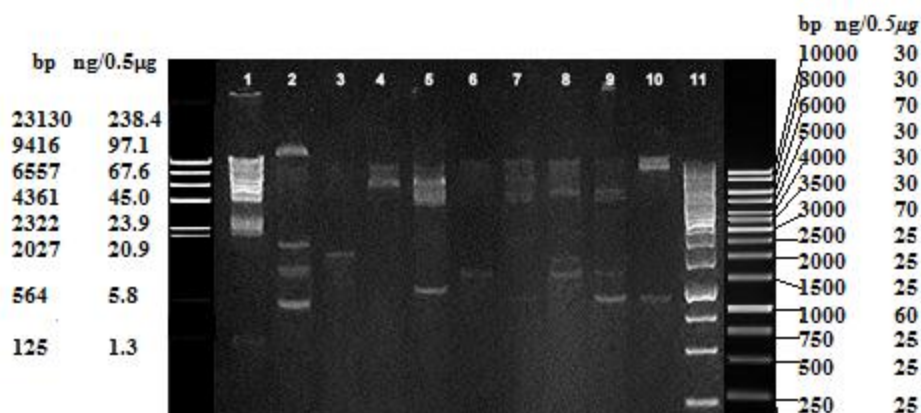


Figura 9. Perfil plasmídico de los aislados de *E. coli*. Gel agarosa 1,2%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Intercalante usado Gel Red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el primero y en el último de los carriles se observan los marcadores moleculares *Lambda Hind III* y *1Kb* (Promega), respectivamente; carriles de 2 a 10, se encuentran los aislados 3, 5, 6, 9, 11, 13, 14, 16 y 18 de *E. coli*, correspondientemente.

Fuente: este estudio

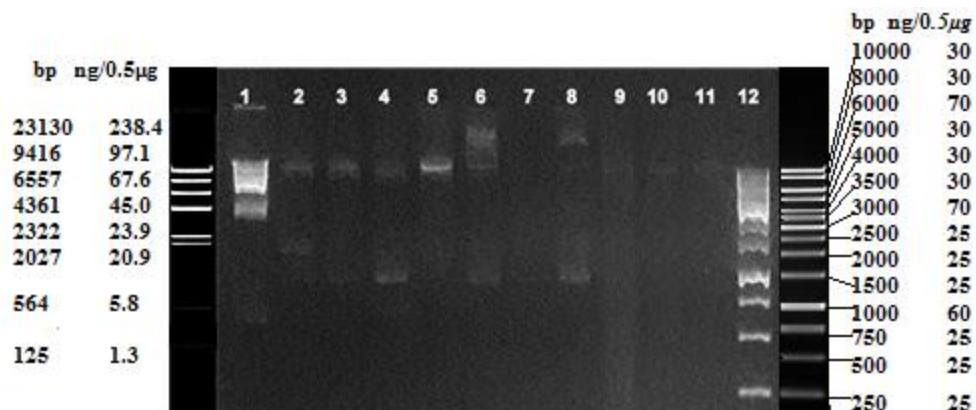


Figura 10. Perfil plasmídico de los aislados de *E. coli*. Gel agarosa 1,2%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Intercalante usado Gel Red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el primero y último de los carriles se observan los marcadores moleculares *Lambda Hind III* y *1Kb* (Promega); carriles de 2 a 8, aislados 19, 20, 21, 22, 26, 28, 31 de *E. coli*, respectivamente; carriles 9 a 11, controles positivos.

Fuente: este estudio

Tabla 9. Perfil plasmídico de los aislados de *E. coli* provenientes de muestras de orina.

Aislados	Numero de Plásmidos	Tamaño Kb
	1	11,765
Aislado 3 MN094113	2	1,96
	3	1,376
	4	0,919
Aislado 5 MN094115	1	1,804
Aislado 6 MN094116	1	10,706
	2	6,898
Aislado 9 MN094118	1	10,706
	2	7,326
	3	4,247
	4	1,117
Aislado 11 MN094120	1	10,706
	2	1,339
Aislado13 MN094122	1	10,706
	2	5,571
	3	1,02
Aislado 14 MN094123	1	10,706
	2	5,571
	3	1,618
	4	1,339
Aislado 16 MN094125	1	10,706
	2	5,571

3	4,636
4	1,352
5	0,982

Tabla 9. Perfil plasmídico de los aislados de *E. coli* provenientes de muestras de orina.

Aislados	Numero de Plásmidos	Tamaño Kb
Aislado 18 MN094127	1	10,706
	2	9,835
	3	0,964
Aislado 19 MN094128	1	10,706
	2	1,621
Aislado 20 MN094129	1	10,706
	2	1,052
Aislado 21 MN094130	1	9,081
	2	1,052
Aislado 22 MN094131	1	10,706
	1	18,769
Aislado 26 MN094135	2	10,706
	3	1,052
	1	1,052
Aislado 31 MN121155	1	16,462
	2	1,052

Fuente: este estudio

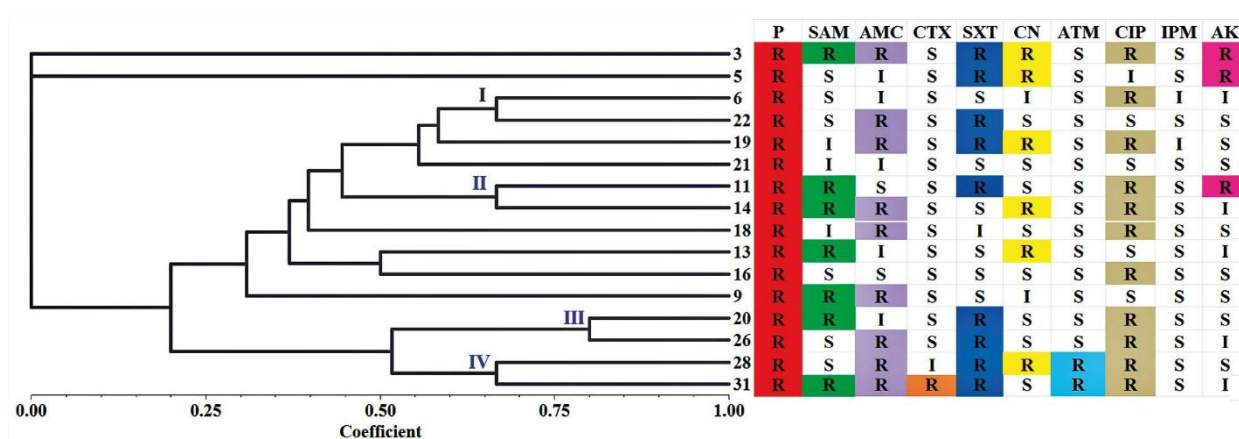


Figura 11. Dendrograma del perfil plasmídico de los aislados de *E. coli*. Construido usando el software NTSYS Spc 2.1 y tomando los criterios *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean* (UPGMA). La resistencia a los diversos antibióticos se ha marcado con un color diferente. Rojo (resistencia a P), verde (resistencia a AMC), naranja (resistencia a CTX), azul (resistencia a SXT), amarillo (resistencia a CN), azul claro (resistencia a ATM), café claro (resistencia a CIP) y fucsia (resistencia a AK).

Fuente: este estudio

8.4. Amplificación de genes vinculados a la resistencia a antibióticos de los aislados de *E. coli* en DNA cromosomal

De las 32 muestras analizadas para la amplificación de genes vinculados a la resistencia, en 13 se encontraron genes *bla*CTXM1, *bla*TEM, *FosA*, *Mcr -1* y *bla*SHVI, y en cuatro de ellos (1, 13, 27 y 31) se presentaron más de un gen de resistencia (Figura 12). El gen que más predominó fue *bla*TEM (37,5%) seguido por *bla*CTXM1, *bla*SHVI y finalmente (9,3%) *FosA* y *Mcr -1* (3,1%); cabe resaltar que las muestras restantes presentaron amplificación de productos cuyo tamaño molecular no correspondía con lo citado en literatura (Anexo 2).

Los resultados mencionados anteriormente se pueden contrastar con lo obtenido por Ortega (2017), quien determinó BLEE en *E. coli* y *K. pneumoniae* a través de pruebas moleculares en urocultivos y concluyó que 28,8% de los aislados de *E. coli* expresaban el gen *bla*TEM y 2,2% el gen *bla*SHV. En una investigación similar Nocua-Báez et al. (2017) evaluaron mediante técnicas moleculares la presencia de BLEE en nueve hospitales de Colombia en *E. coli* y establecieron que 6,9% de los aislados expresaron genes *bla*TEM-1 y

*bla*CTM-X-15. Adicionalmente, Birgy et al. (2018) informaron de un primer caso de un menor en Francia infectado por una cepa de *E. coli* resistente a múltiples fármacos con presencia de genes *bla* CTX-M-55, *Mcr-1* y *FosA*.

En comparación, Hoang et al. (2017) aislaron cepas de *E. coli* de adultos sanos en Vietnam y señalaron la presencia marcada de genes tipo *bla*CTX-M (*bla*CTX-M-9 y *bla*CTX-M-1), seguidas de genes *bla*TEM. Mahalingam et al. (2018) analizaron la prevalencia de los genes *bla*CTX-M, *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*VIM, *bla*NDM y *bla*OXA en *E. coli* y describieron que 95% de los aislados presentaba betalactamasas *bla*TEM y 62% contenían el tipo *bla*CTX-M.

En este sentido, se infiere que los porcentajes obtenidos en este estudio no difieren en su mayoría de otras investigaciones realizadas en Colombia y en otros países; sin embargo, se destaca que los resultados pueden estar subestimados, puesto que, como se informó anteriormente algunas muestras presentaron amplicones con tamaño diferente a lo esperado y esto puede estar relacionado con variantes que pueden presentar los genes de resistencia, los cuales no fueron evaluados en este trabajo (Rada , Hernández-Gómez , Restrepo, & Villegas , 2019).

Finalmente, se evidencia que este tipo de patógenos representan una gran amenaza a nivel sanitario; puesto que, existen muy pocos tratamientos para contrarrestar las enfermedades causadas por microorganismos resistentes, adicionalmente, la capacidad de diseminación y transferencia de genes de resistencia puede generar situaciones en las cuales no exista opción de tratamiento disponible para enfermedades que anteriormente eran de fácil tratamiento.



Figura 12. Verificación de la amplificación de genes de resistencia en DNA

cromosomal de aislados de *E. coli*. Gel de agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos, tratado con intercalante Gel Red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el primero y en el último de los carriles se observan el marcador molecular *1Kb* (Promega), en el carril 10 se encuentra el marcador molecular *Lambda Hind III* (Promega); en los carriles de 2 a 4, el gen *blaCTXM1* de los aislados 27, 30 y 31; carriles 5 y 6, gen *blaKPCF* de los aislados 21 y 22; carriles de 9 a 14, gen *blaTEM* de los aislados 1, 4, 13, 18 y 31; carriles de 15 a 17, gen *blaSHVI* de los aislados 1, 13 y 28; carril 18, gen *Mcr-1* del aislado 27 y carril 19, gen *FosA* del aislado 33.

Fuente: este estudio

8.5. Amplificación de genes vinculados a la resistencia a antibióticos de los aislados de *E. coli* en DNA plasmídico

En muestras de DNA plasmídico se detectó la presencia de genes como: *bla*TEM, *bla*SHV1 y *bla*CTXM1 (Figura 13). El gen que más predominó fue *bla*TEM (37,5%) seguido por *bla*SHVI (25%) y *bla*CTXM1 (6,2%); de igual manera se señala que las muestras restantes no presentaron amplificación o se generaron productos cuyo tamaño molecular no correspondía con lo citado en literatura (Anexo 2). Teniendo en cuenta que no fue posible determinar con certeza la presencia de los genes en cada uno de los plásmidos; se puede inferir que el gen *bla*TEM, se encuentra en el plásmido con un tamaño aproximado de 10,7 Kb, ya que este estuvo presente en 6 de las 7 muestras analizadas y es uno de los genes que confiere resistencia a penicilinas y cefalosporinas de tercera generación, lo que concordó con los perfiles de resistencia analizados en este estudio; adicionalmente se supone que la razón por la cual el aislado 31 no presentó el plásmido de 10,7 Kb, fue porque se detectó de manera conjunta la presencia del gen *bla*TEM y *bla*CTXM1 y pueden estar codificados por un plásmido de mayor tamaño.

Lo descrito anteriormente concuerda con lo reportado por Dobiasova & Dolejska (2016) quienes señalaron que los linajes más diseminados de plásmidos de resistencia en Europa son aquellos que albergan genes *bla*TEM y *bla*SHV1; consecuentemente, Hoang et al. (2017) indicaron que en Vietnam los genes de resistencia más prevalentes fueron, *bla*TEM y variantes del gen *bla*CTXM1 y se encontraban directamente asociados con plásmidos de diferente tamaño molecular. Recientemente Guzman et al. (2019), caracterizaron aislados de *E. coli* multirresistente causantes de enfermedades del tracto urinario en Venezuela,

encontraron que 65,4% de los aislados revelaron el gen *bla*TEM, 34,6% *bla*CTX-M y 23,1% *bla*SHV, los cuales se transfirieron mediante plásmidos.

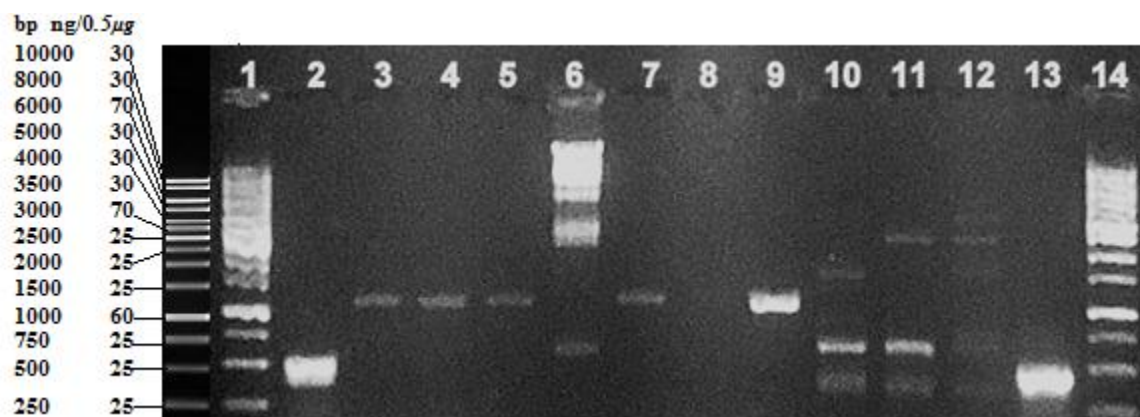


Figura 13. Verificación de la amplificación de genes de resistencia en DNA

plasmídico de aislados de *E. coli*. Gel agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos, tratado con el intercalante Gel Red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el primero y en el último de los carriles se observa el marcador molecular *1Kb*. (Promega), en el carril 6 se encuentra el marcador molecular *Lambda Hind III* (Promega); carril 2, gen *bla*CTXM1 del aislado 31; carriles de 3 a 9, gen *bla*TEM de los aislados 13, 16, 18, 22, 26 y 31; carriles de 10 a 13, gen *bla*SHV1 de los aislados 3, 5, 9 y 28.

Fuente: este estudio

8.6. Amplificación de la subunidad 16S rRNA

Se obtuvo un producto de PCR de aproximadamente 1500 pb (Figura 14), por lo tanto, se dedujo que el amplificado obtenido fue el esperado para el gen 16s rRNA, ya que según estudios realizados por Da Fonseca et al. (2015) en bacterias aisladas del ambiente y por Cuadra (2017), se reportó que el gen 16s rRNA posee un tamaño molecular de 1500 pb.

Además, cabe resaltar que el gen 16s rRNA suministra información valiosa para la caracterización molecular de especies bacterianas, ya es un marcador ampliamente utilizado en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana; adicionalmente, presenta características importantes como, tamaño relativamente grande, alto grado de conservación, precisión y fiabilidad de los resultados en cuanto a distancias evolutivas (Arias, Gabriel, & Castañeda González, 2016).

8.6.1. Identificación de los aislados por comparación con las bases de datos RDP y Genbank - análisis filogenético

En la tabla 10 se puede observar la identificación de los aislados bacterianos, producto de la comparación de las secuencias con dos bases de datos (RDP y GenBank), teniendo en cuenta el porcentaje de identidad y el posible origen del aislado (muestra clínica); se identificó un total de 32 muestras, las cuales corresponden en su totalidad a *E. coli*. Este resultado concuerda con la identificación bioquímica y morfológica realizada previamente.

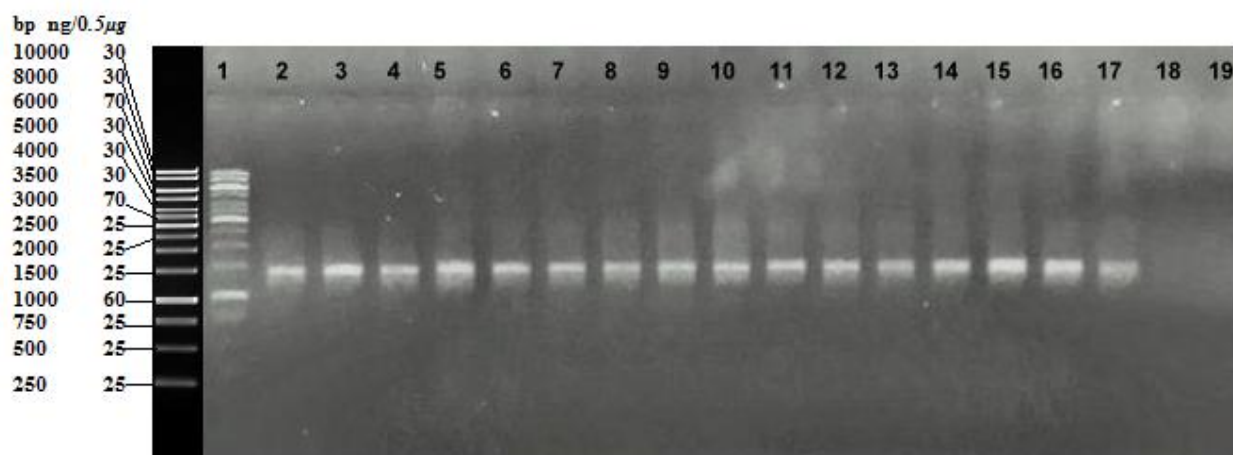


Figura 14. Verificación de la amplificación de la subunidad 16S rRNA. Gel agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos, tratado con el intercalante Ez Visión (AMRESCO) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda 302 nm. En el primer carril se observa el marcador molecular *1Kb.* (Promega); carriles de 2 a 17, aislados 1 a 17 de *E. coli*; carril 18, control negativo.

Fuente: este estudio

Tabla 10. Identificación de las muestras por comparación en RDP y GenBank.

Aislado	RDP	% de identidad	Genbank	% de identidad	Identificación final
Aislado 1 MN094112	<i>E. coli</i>	92,5	<i>E. coli</i> BEG21	99,03	<i>E. coli</i>
	<i>E. coli</i>	92,5			
Aislado 3 MN094113	Bacteria no cultivable	94,5	<i>E. coli</i> IRQBAS57	98,23	<i>E. coli</i>
	<i>E. coli</i>	94,1			
Aislado 4 MN094114	<i>E. coli</i>	93,3	<i>E. coli</i> Gut07	97,56	<i>E. coli</i>
	<i>E. coli</i>	93,1			
Aislado 5 MN094115	Bacteria no cultivable	94,8	<i>E. coli</i> TU-8	97,97	<i>E. coli</i>
	<i>E. coli</i>	95,9			
Aislado 6 MN094116	<i>E. coli</i>	97,8	<i>E. coli</i> TU-10	97,91	<i>E. coli</i>
	<i>E. coli</i>	96,6			
Aislado 7 MN121153	<i>E. coli</i>	64,2	<i>E. coli</i> 50579417	98,05	<i>E. coli</i>
	<i>Escherichia</i> sp.	62,9			
Aislado 8 MN094117	<i>E. coli</i>	87,5	<i>E. coli</i> E18	96,61	<i>E. coli</i>
	Bacteria no cultivable	87,6			
Aislado 9 MN094118	<i>E. coli</i>	91,8	<i>E. coli</i> CNM 477-02	98,11	<i>E. coli</i>
	Bacteria no cultivable	91,8			
Aislado 10 MN094119	<i>E. coli</i>	92,2	<i>E. coli</i> 1428	97,55	<i>E. coli</i>
	<i>E. coli</i>	91,7			
Aislado 11 MN094120	<i>E. coli</i>	96,6	<i>E. coli</i> 8	97,58	<i>E. coli</i>
	<i>E. coli</i>	95,8			
Aislado 12 MN094121	<i>E. coli</i>	98,1	<i>E. coli</i> EC3653	98,22	<i>E. coli</i>
	<i>E. coli</i>	96,7			
Aislado 13 MN094122	<i>E. coli</i>	91,3	<i>E. coli</i> EGE 4946786- 102	97,84	<i>E. coli</i>
	<i>E. coli</i>	92,2			
Aislado 14 MN094123	<i>E. coli</i>	95,8	<i>E. coli</i> TU-12	98,47	<i>E. coli</i>
	<i>E. coli</i>	94,8			
Aislado 15 MN094124	Bacteria no cultivable	94,9	<i>E. coli</i> EC3653	97,75	<i>E. coli</i>

Tabla 10. Identificación de las muestras por comparación en RDP y GenBank.

Aislado	RDP	% de identidad	Genbank	% de identidad	Identificación final
Aislado 16 MN094125	<i>E. coli</i>	94	<i>E. coli</i> NRC76	97,7	<i>E. coli</i>
	<i>E. coli</i>	93			
Aislado 17 MN094126	Bacteria no cultivable	94,1	<i>E. coli</i> TU-10	98,31	<i>E. coli</i>
	<i>E. coli</i>	94,6			
Aislado 18 MN094127	<i>E. coli</i>	95,5	<i>E. coli</i> IRQBAS57	98,39	<i>E. coli</i>
	<i>E. coli</i>	94,3			
Aislado 19 MN094128	<i>E. coli</i>	95,8	<i>E. coli</i> EC3653	97,67	<i>E. coli</i>
	<i>E. coli</i>	94,8			
Aislado 20 MN094129	<i>E. coli</i>	95,9	<i>E. coli</i> IRQBAS57	97,81	<i>E. coli</i>
	<i>E. coli</i>	94,9			
Aislado 21 MN094130	<i>E. coli</i>	95,5	<i>E. coli</i> EGE 4874147-98	96,87	<i>E. coli</i>
	<i>E. coli</i>	94,3			
Aislado 22 MN094131	Bacteria no cultivable	93,9	<i>E. coli</i> O45:H2	97,53	<i>E. coli</i>
	<i>E. coli</i>	94			
Aislado 23 MN094132	<i>E. coli</i>	96,3	<i>E. coli</i> EGE 4874147-98	97,62	<i>E. coli</i>
	<i>E. coli</i>	95,3			
Aislado 24 MN094133	<i>E. coli</i>	95,7	<i>E. coli</i> IRQBAS57	97,81	<i>E. coli</i>
	<i>E. coli</i>	94,7			
Aislado 25 MN094134	<i>E. coli</i>	93,9	<i>E. coli</i> RCB249	97,68	<i>E. coli</i>
	<i>E. coli</i>	94,2			
Aislado 26 MN094135	<i>E. coli</i>	95,9	<i>E. coli</i> IRQBAS57	97,97	<i>E. coli</i>
	<i>E. coli</i>	94,9			
Aislado 27 MN094136	<i>E. coli</i>	94,8	<i>E. coli</i> IRQBAS57	97,58	<i>E. coli</i>
	<i>E. coli</i>	94,3			
Aislado 28 MN094137	<i>E. coli</i>	94,4	<i>E. coli</i> Gut07	98,47	<i>E. coli</i>
	<i>E. coli</i>	93,9			
Aislado 29 MN121154	<i>E. coli</i>	91,5	<i>E. coli</i> HCD22-1	99,3	<i>E. coli</i>
	<i>E. coli</i>	90,3			
Aislado 30 MN094138	<i>E. coli</i>	94,3	<i>E. coli</i> IAUK 8731	96,95	<i>E. coli</i>
	<i>E. coli</i>	93,3			
Aislado 31 MN121155	<i>E. coli</i>	90,7	<i>E. coli</i> NRC129	96,25	<i>E. coli</i>
	<i>E. coli</i>	90			
Aislado 32 MN121156	<i>E. coli</i>	93	<i>E. coli</i> EGE 4874147-98	96,91	<i>E. coli</i>
	<i>E. coli</i>	92			
Aislado 33 MN121157	<i>E. coli</i>	94,8	<i>E. coli</i> IRQBAS57	97,58	<i>E. coli</i>
	<i>E. coli</i>	94,3			

Fuente: este estudio

En el árbol filogenético se evidencia la formación de dos clusters, el primero constituido por los aislados de *E. coli* de origen clínico incluyendo la raíz interna (*E. coli* ATCC 25992) y el segundo conformado por el *outgroup* o raíz externa (*Methanocaldococcus jannaschii*). En el primer cluster, se observa que la distancia evolutiva entre los aislados es mínima, debido a que todos pertenecen a la misma especie; sin embargo, existen variaciones propias de cada aislado, las cuales pueden estar relacionadas con el medio en el que se desarrolla cada aislado bacteriano y pueden generarse por procesos de mutación (Figura 15). Además, es de recalcar que todas las agrupaciones formadas en el árbol se encuentran relacionadas directamente con el patrón de resistencia a los antibióticos, como es el caso de la agrupación entre los aislados 16 y 23, los cuales presentan una alta similaridad en los patrones de resistencia y sensibilidad a los antibióticos empleados. Por otra parte, también se logró detectar un estado de monoclonal entre los aislados 27 y 33 de *E. coli*, hecho que puede estar asociado con la diseminación de resistencia (P y CIP).



P	SAM	AMC	CTX	SXT	CN	ATM	CIP	IPM	AK
R	R	R	S	S	R	S	R	S	I
R	I	R	R	S	I	R	R	S	I
R	S	S	S	S	S	S	R	S	S
R	I	R	S	R	S	S	R	S	S
R	S	I	S	S	I	S	R	I	I
R	R	I	S	R	I	S	R	S	R
R	S	R	S	R	S	S	S	S	S
R	S	R	S	R	S	S	R	S	I
R	I	R	S	I	S	S	R	S	S
R	I	R	S	R	R	S	R	I	S
R	R	R	I	R	R	R	R	I	I
R	S	I	S	R	R	S	I	S	R
R	R	I	S	R	S	S	R	S	S
R	R	R	S	R	R	S	R	S	R
R	S	I	R	R	S	R	R	S	S
R	S	R	S	S	R	S	R	S	S
R	R	I	S	S	S	S	S	S	S
R	R	I	S	R	R	S	R	I	S
R	R	S	S	R	S	S	R	S	R
R	I	I	S	S	S	S	S	S	S
R	R	R	R	R	S	R	R	S	I
R	I	R	S	R	S	S	S	S	I
R	I	R	S	R	R	S	S	S	S
R	R	R	S	S	I	S	S	S	S
R	S	R	S	R	S	S	S	S	S
R	S	R	I	R	R	R	R	S	S
R	R	I	S	R	R	S	S	S	S
R	R	S	R	R	R	R	S	I	R
R	R	I	S	S	R	S	S	S	I
R	R	I	S	S	S	R	S	S	R
R	R	R	R	R	R	R	R	I	R
R	R	R	R	R	R	R	R	S	R

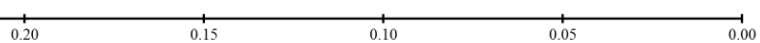


Figura 15. Árbol filogenético de los aislados de *E. coli*. Construido usando el software Mega X 10.1 y tomando los criterios *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean* (UPGMA). La resistencia a los diversos antibióticos se ha marcado con un color diferente. Rojo (resistencia a P), verde (resistencia a AMC), naranja (resistencia a CTX), azul (resistencia a SXT), amarillo (resistencia a CN), azul claro (resistencia a ATM), café claro (resistencia a CIP) y fucsia (resistencia a AK).

Fuente: este estudio

8.7. Amplificación de secuencias intergénicas de consenso repetitivas de enterobacterias (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR, ERIC-PCR*)

En la figura 16 y 17 se evidencian los diferentes perfiles generados mediante la técnica ERIC-PCR, las muestras presentaron bandas con tamaños que oscilaban entre 4,7 y 0,2 Kb, se evidenciaron 20 perfiles y la banda compartida por todos los aislados fue la de 0,2 Kb. El análisis de similaridad mostró cuatro estados clonales genéticamente idénticos con un porcentaje de similaridad del 100%. Las agrupaciones idénticas exhibieron una relación directa con resistencia a penicilina y cada agrupación presentó un patrón propio de sensibilidad a los antibióticos, el estado clonal I mostro sensibilidad a trimetropin-sulfametoxazol, cefotoxime, imipenem y ciprofloxacina; estado II sensibilidad a aztreonam; estado III sensibilidad a aztreonam, imipenem y cefotoxime y estado IV sensibilidad a amikacina e imipenem (Figura 18).

Estas técnicas moleculares como lo reportaron Jena, Debata, Sahoo, Gaur y Subudhi (2017) & López-Ramírez et al. (2018), permiten analizar la relación clonal de los microorganismos, discriminar su diseminación e identificar poblaciones; de esta manera se

identificaron cuatro estados clonales predominantes en los aislados de *E. coli* en un ambiente hospitalario, los cuales, comparten características de resistencia a antibióticos específicos. Igualmente, se evidenció que el estado clonal I presentaba mayor número de aislados y, por lo tanto, se puede inferir que estos clones pueden ser responsables de la diseminación de resistencia; sin embargo, es necesario realizar estudios más analíticos, con el fin de estimar el verdadero impacto de la diseminación clonal. Por otra parte, los valores de similaridad bajos en las demás agrupaciones pueden atribuirse a eventos genéticos como mutaciones, inserciones o deleciones que ocurren de manera espontánea y hacen parte de la evolución propia de cada población (López-Ramírez, et al., 2018).

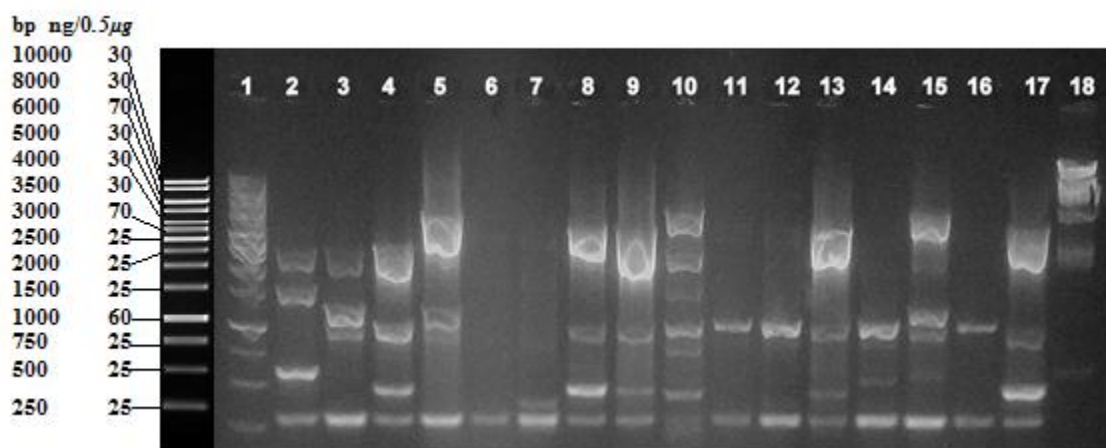


Figura 16. Verificación de la amplificación ERIC-PCR. Gel agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos, tratado con el intercalante Gel red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el primer carril se observa el marcador molecular *1Kb* (Promega); carriles de 2 a 17, aislados 1 a 17 de *E. coli*.

Fuente: este estudio

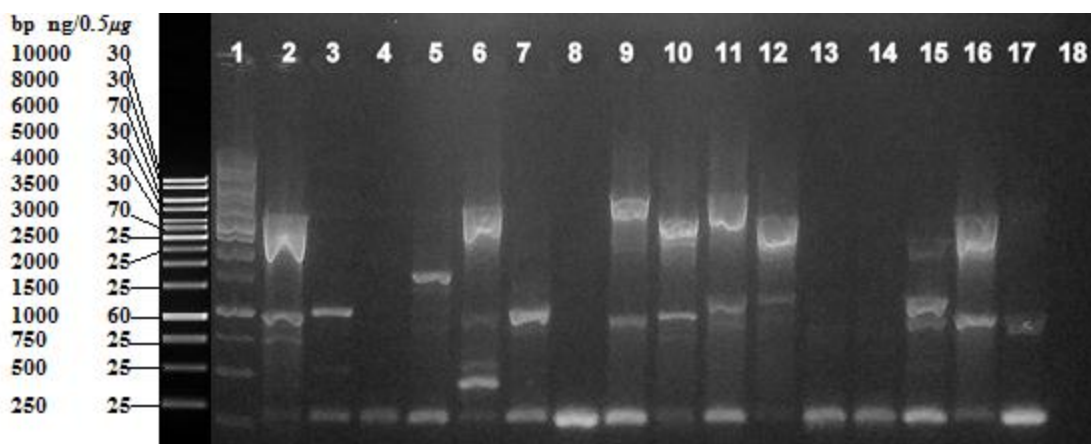


Figura 17. Verificación de la amplificación ERIC-PCR. Gel agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos, tratado con el intercalante Gel red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el primer carril se observa el marcador molecular *1Kb* (Promega); carriles de 2 a 17, aislados 18 a 33 de *E. coli*; carril 18 control negativo.

Fuente: este estudio

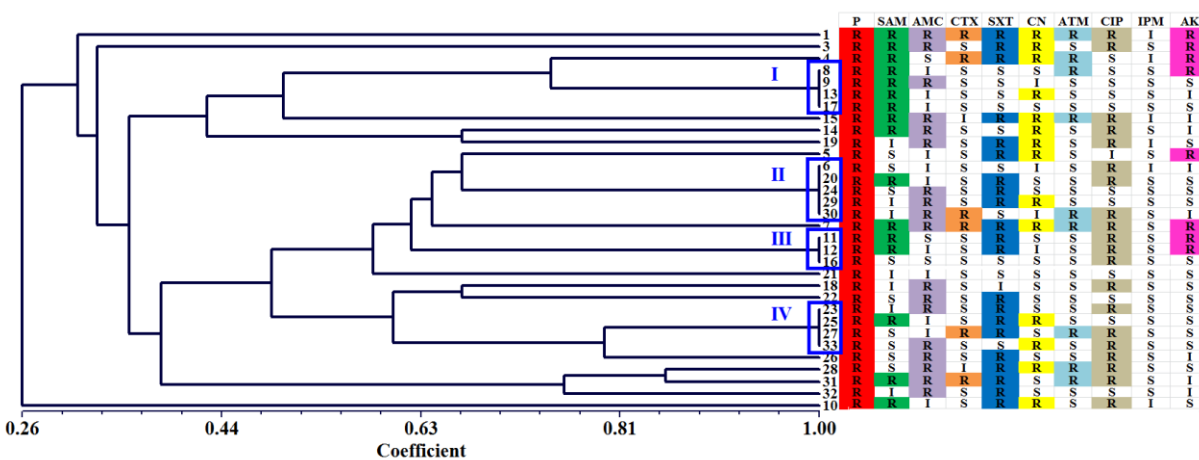


Figura 18. Dendrograma del perfil ERIC-PCR de los aislados de *E. coli*. Construido usando el software NTSYS Spc 2.1 y tomando los criterios *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean* (UPGMA). La resistencia a los diversos antibióticos se ha marcado con

un color diferente. Rojo (resistencia a P), verde (resistencia a AMC), naranja (resistencia a CTX), azul (resistencia a SXT), amarillo (resistencia a CN), azul claro (resistencia a ATM), café claro (resistencia a CIP) y fucsia (resistencia a AK). Se evidencian aislados clonales (marcados en cuadros azules) en cada uno de los clusters con coeficiente de similitud de 100%.

Fuente: este estudio

Teniendo en cuenta tanto la caracterización microbiológica como molecular de los 32 aislados de *E. coli* se concluyó, que existe una alta diversidad a nivel genético (ERIC-PCR, perfiles plasmídicos y genes de resistencia) y fenotípico (perfiles de resistencia), lo que conlleva a un alto riesgo para la comunidad; debido a que constantemente se están generando nuevas variantes de resistencia y los tratamientos tradicionales están perdiendo eficacia frente a estos microorganismos; por lo tanto es importante establecer planes de vigilancia y control frente al uso adecuado de los antibióticos, principal fuerza de selección de microorganismos resistentes; además, es importante establecer estrategias de mitigación exitosas para la resistencia ambiental, como lo propuesto por Bengtsson-Palme, Kristiansson & Larsson (2018) quienes indicaron que existen tres estrategias importantes: evitar la creación de entornos que seleccionen, movilicen y permitan la persistencia de genes de resistencia en comunidades bacterianas, reducir las rutas de dispersión de bacterias resistentes al microbioma humano y limitar la presión de selección para patógenos resistentes.

8.8. Evaluación de la tasa de transformación vía plasmídica de una población de *E. coli* sensible a antibióticos

8.8.1. Cinética de crecimiento.

En la figura 19 se indica la cinética de crecimiento para *E. coli* resistente en presencia de antibiótico (trimetropim-sulfametoxazol), teniendo en cuenta tres replicas biológicas consideradas como tal, debido a que se encontraban bajo las mismas condiciones experimentales y no existían diferencias estadísticamente significativas entre ellas (p- valor: 0,07). Inicialmente, en la figura se puede establecer cuatro fases características del crecimiento bacteriano; fase de latencia (0 a 4 horas), en la cual la población bacteriana se encuentra adaptándose a las condiciones del medio, fase exponencial (4 a 14 horas), en la que se inician procesos de división celular; fase estacionaria (14 a 16 horas) caracterizada por que alguno de los nutrientes esenciales se agota y cesa el crecimiento y fase de muerte (16 a 28 horas) en la que la población muere, porque se acumulan una gran cantidad de desechos metabólicos y se agotan los nutrientes del medio.

En cuanto a la cinética de crecimiento para *E. coli* resistente en ausencia de antibiótico, se observa únicamente tres fases, exponencial (0 a 16 horas), estacionaria (16 a 20 horas) y muerte (20 a 28 horas); cabe resaltar, que entre las réplicas no existieron diferencias estadísticamente significativas (p- valor: 0,89) (Figura 20). Teniendo en cuenta las cinéticas de *E. coli* en presencia y ausencia de antibiótico se puede inferir que el antibiótico influye parcialmente en el comportamiento de la población bacteriana, porque se manifiesta la prolongación o aceleración en el tiempo de algunas fases del crecimiento, esto puede estar relacionado con el mecanismo de defensa que expresa la bacteria resistente, debido a que

algunos autores como Hernando-Amado, Sanz-Garcia, Blanco, & Martinez (2017) y Bengtsson-Palme, Kristiansson & Larsson (2018) indicaron, que los mecanismos de resistencia pueden generar costos de acondicionamiento físico y alteraciones en el crecimiento, aunque estos costos pueden reducirse a medida que el microorganismo adecua estos mecanismos generando una compensación a través del tiempo.

Uno de los principales mecanismos de resistencia a trimetropim-sulfametoxazol es la transferencia horizontal mediada por plasmidos, los cuales pueden transportar genes *df_r* que codifican enzimas dihidrofolato-reductasas resistentes; por lo tanto, se ha inferido que esta vía de resistencia genera un menor costo y por ende una menor alteración en su crecimiento, con relación a la resistencia causada por mutaciones cromosómicas (Vigliarolo, Gazzeli, Bonofiglio, Mollerach, & Lopardo, 2018 & Vogwill & MacLean, 2015).

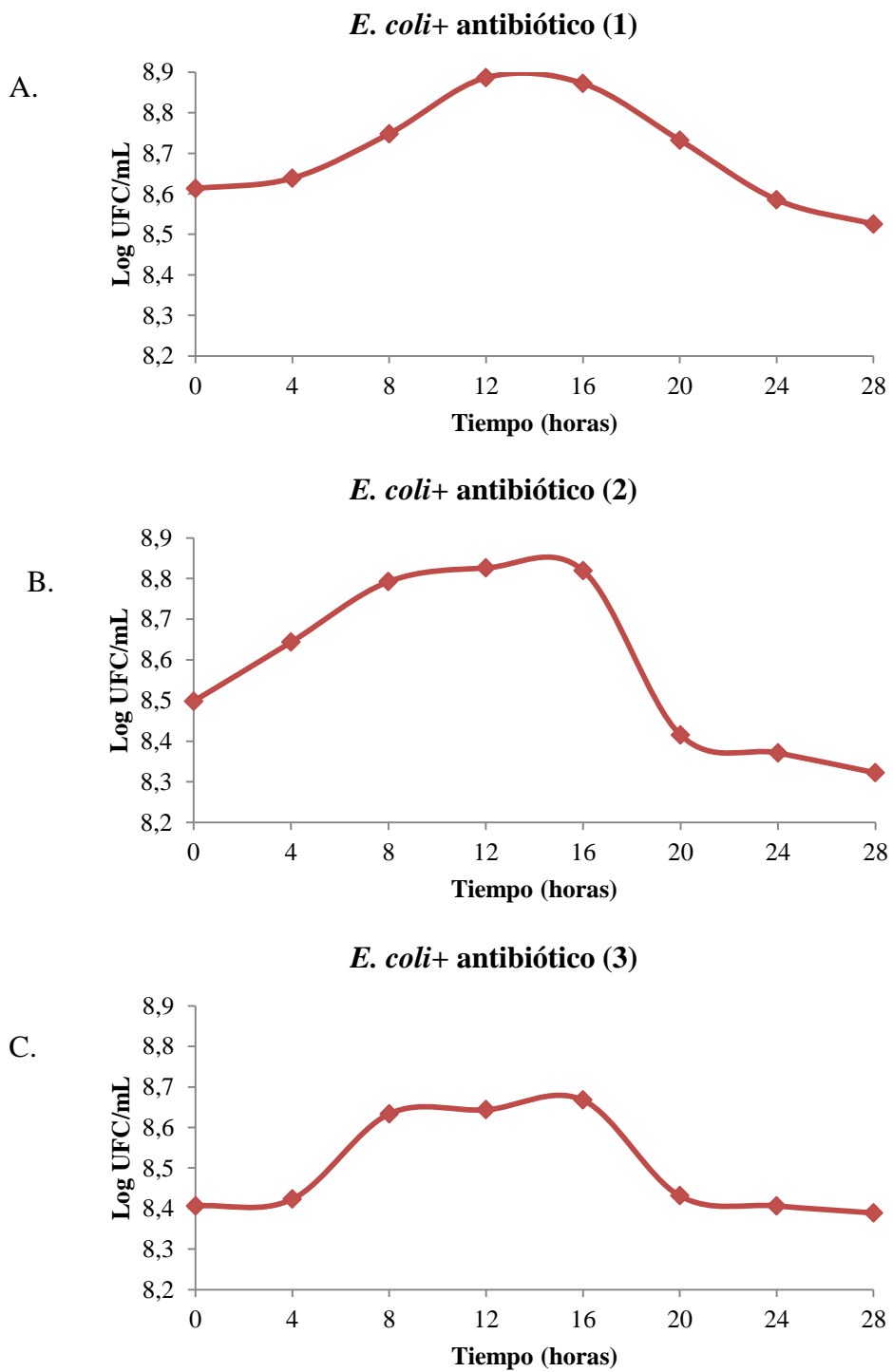
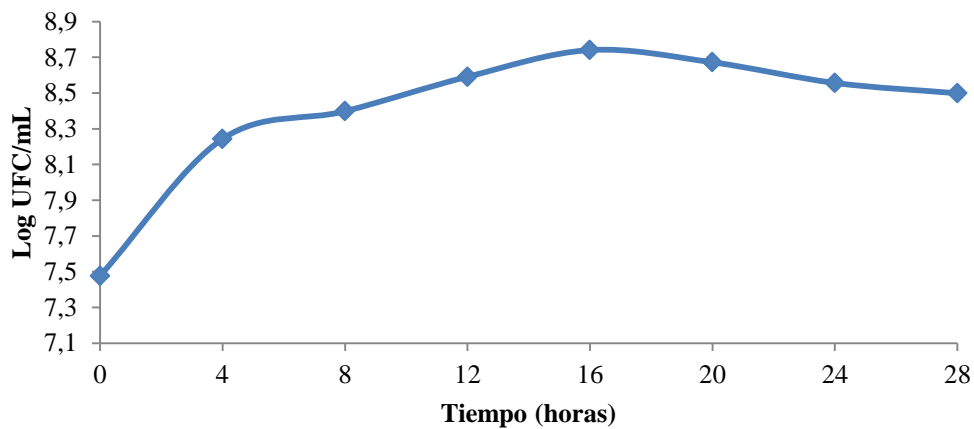


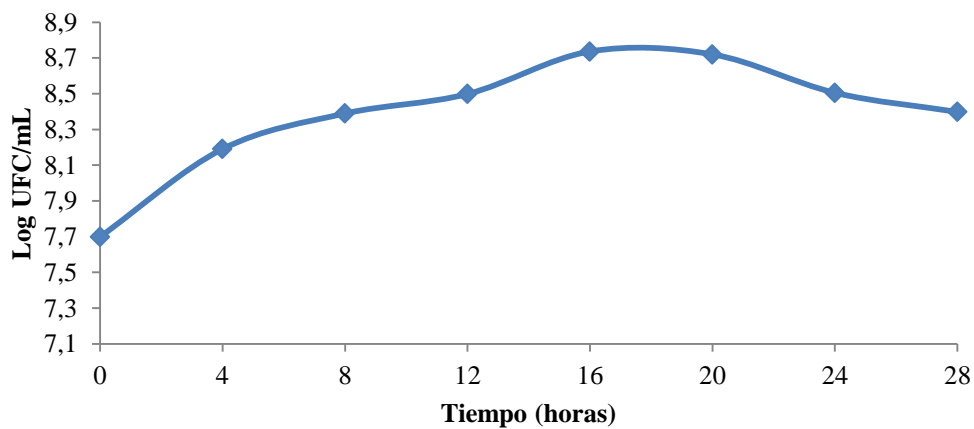
Figura 19. Cinética de crecimiento de *E. coli* en presencia de SXT (0,2 mg /mL).

A. Replica 1; B. Replica 2 y C. Replica 3. Programa usado Excel.

***E. coli*- antibiótico (1)**

Fuente: este estudio.

A.

***E. coli*- antibiótico (2)**

B.

C.

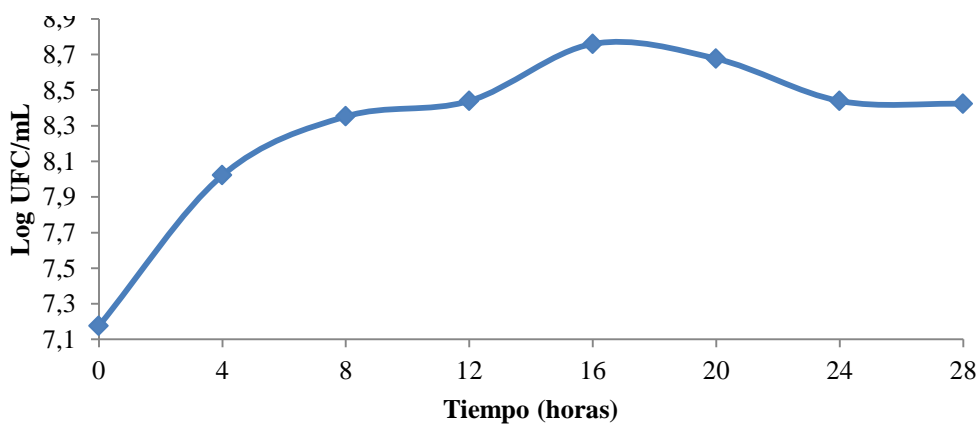


Figura 20. Cinética de crecimiento de *E. coli* en ausencia de antibiótico. A. Replica 1; B. Replica 2 y C. Replica 3. Programa usado Excel

Fuente: este estudio

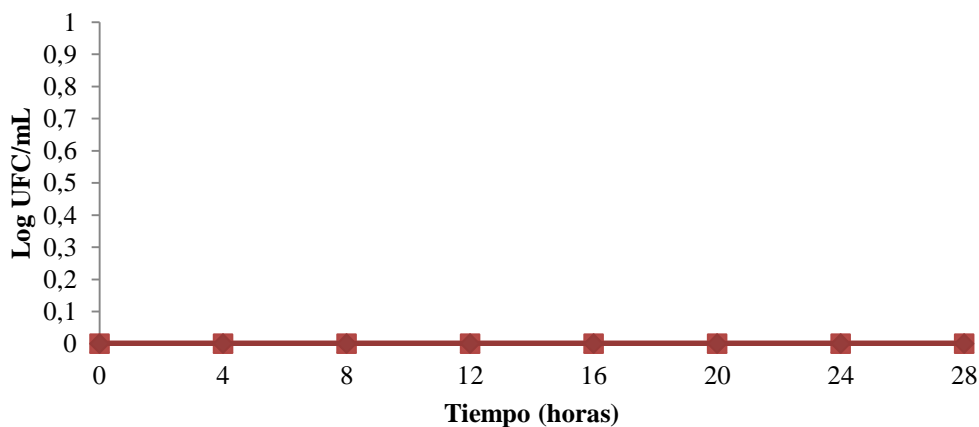
En contraste, el crecimiento de *S. enterica* en presencia del antibiótico se inhibió completamente en las tres replicas biológicas y en ausencia del antibiótico la bacteria creció normalmente, exhibiendo tres fases de crecimiento: exponencial (0 a 12 horas), estacionaria (12 a 16 horas) y muerte (16 a 28 horas). No se evidenció la fase de latencia, porque se trabajó con un inóculo inicial en fase exponencial, el que se encontraba bajo las mismas condiciones de incubación y concentración de nutrientes, respecto a la unidad experimental (Figura 21 y 22). A través del análisis estadístico se determinó que no existían diferencias estadísticamente significativas entre las réplicas biológicas (p- valor: 0,93).

Los resultados son consecuentes con el antibiograma realizado previamente y con la acción bactericida que presenta el antibiótico; debido a que, la combinación de sulfamidas y trimetropim generan una acción potencializada, inhibiendo la ruta del ácido fólico y la síntesis de timidina, por lo tanto, se bloquea la síntesis de DNA bacteriano y causa la muerte de microorganismos sensibles; sin embargo, es necesario realizar pruebas adicionales con concentraciones menores del antibiótico para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y el comportamiento de la bacteria (Ríos Capcha, 2018).

El MLG fue altamente significativo y explicó 99,2% de la variabilidad en los datos (p-valor: 0,0000); además, se determinó que existe una relación estadísticamente significativa entre la variable dependiente (crecimiento) y las variables independientes (antibiótico y cepa

bacteriana). Mediante la prueba Tukey se comprobó que existen diferencias significativas en la cinética de crecimiento entre bacterias resistentes y sensibles en presencia del antibiótico; esto posiblemente se debe a la estructura fisiológica de las poblaciones bacterianas, ya que se ha establecido según diferentes estudios que en poblaciones heterogéneas de bacterias, aquellas que presentan una débil afinidad de unión del fármaco con el blanco de acción pueden generar resistencia, mientras que aquellas con una alta afinidad se eliminan rápidamente, se destaca que la concentración del antibiótico juega un papel importante en esta

S. enterica + antibiótico (1, 2 y 3)



dinámica; sin embargo, se ha observado que poblaciones sensibles pueden generar cierto grado de resistencia cuando se encuentran bajo una presión de selección (Nguyen, Starosta, Arenz, Sohmen, Dönhöfer, & Wilson, 2014; Ternent, Dyson, Krachler, & Jabbari, 2015 & Krzyzanski & Rao, 2017).

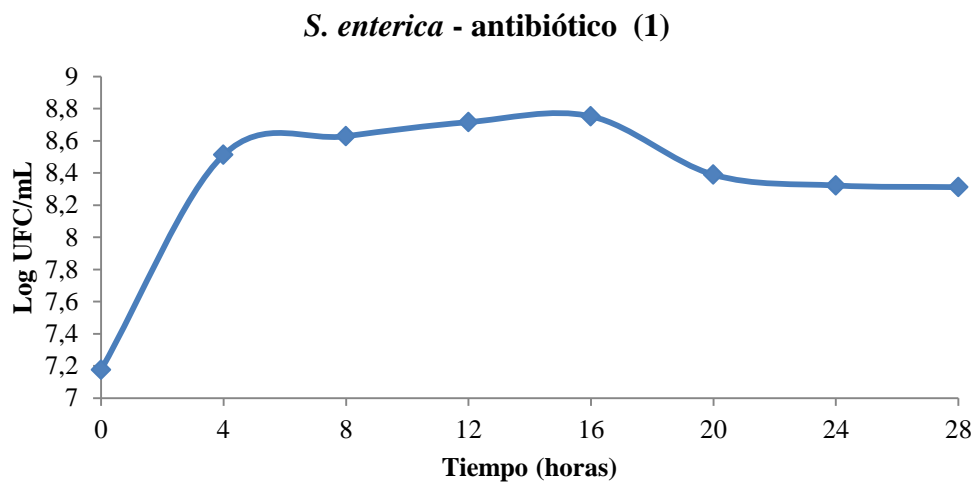
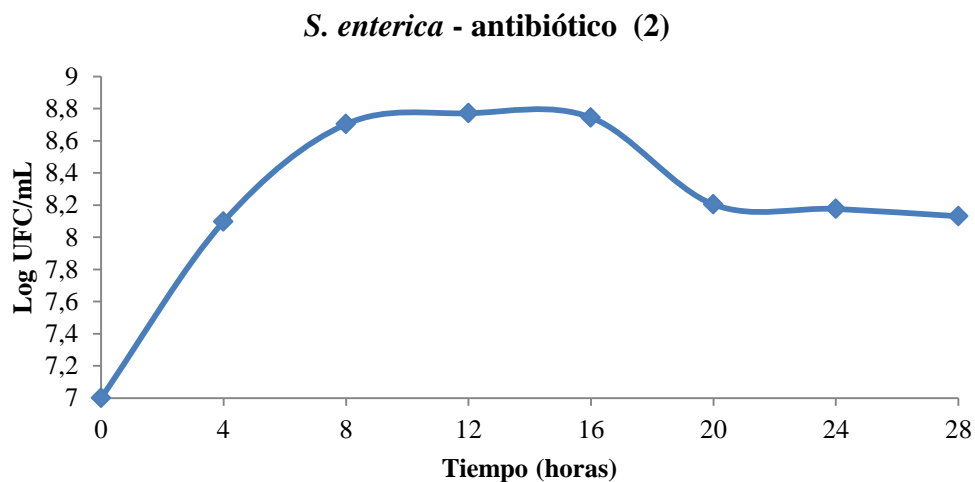


Figura 21. Cinética de crecimiento de *S. enterica* en presencia de SXT (0,2 mg /mL).

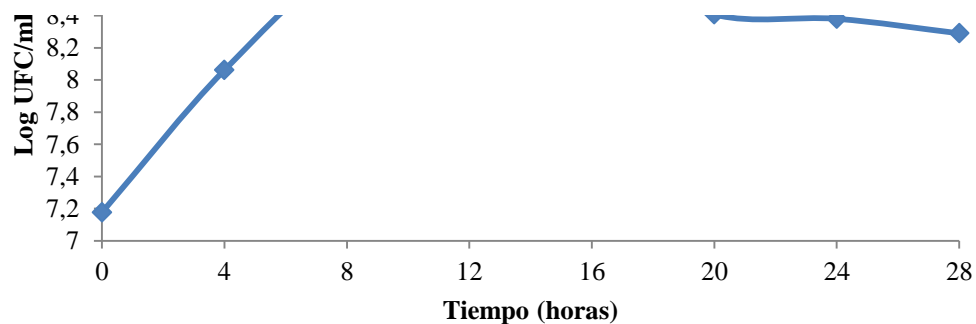
Las denotaciones 1, 2 y 3 representan las réplicas biológicas. Programa usado Excel

Fuente: este estudio.

A.



B.



C.

Figura 22. Cinética de crecimiento de *S. enterica* en presencia de SXT (0,2 mg /mL).

A. Replica 1; B. Replica 2 y C. Replica 3. Programa usado Excel. Fuente: este estudio

8.8.2. Transformación vía plasmídica

La frecuencia de transformación teniendo en cuenta tres replicas biológicas fue del orden de $7,8 \times 10^{-4}$ y $5,2 \times 10^{-3}$ a las 32 y 40 horas, correspondientemente; los controles empleados para este experimento presentaron comportamientos similares a los observados en la etapa previa de la cinética de crecimiento, garantizando las condiciones axénicas y estándar del mismo (Figuras 23, 24, 25 y 26). Mediante el análisis estadístico se estableció que las dos poblaciones bacterianas (sensibles y resistentes) presentan una relación débil de asociación positiva (ρ : 0,28 y p- value: 0,02). Mediante extracción de DNA plasmídico de los tratamientos propuestos se corroboró la transferencia de plásmidos hacia la población de *S. enterica* sensible (Figura 27).

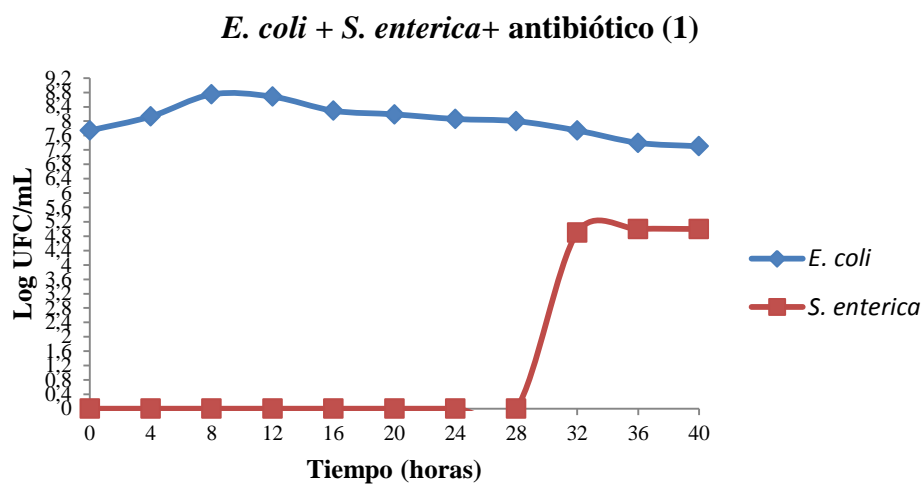
Lo mencionado anteriormente puede compararse con el estudio propuesto por Lyimo et al. (2016) quienes identificaron diferentes tipos de plásmidos y señalaron eficiencias de conjugación para aislados de *E. coli* multirresistente entre 10^{-1} y 10^{-7} ; además establecieron que el plasmido IncA / C era el uno de los más frecuentes y generaba resistencia a antibióticos como ampicilina, sulfonamida, tetraciclina y trimetoprim. Carattoli et al. (2017) realizaron experimentos de transformación entre cepas de *Salmonella* sp. (donadora) y *E. coli* (receptora) empleando un plásmido con resistencia a colistina; en este estudio se determinó

que solo algunas cepas eran capaces de transferir el plásmido por conjugación con una frecuencia de 1×10^{-4} .

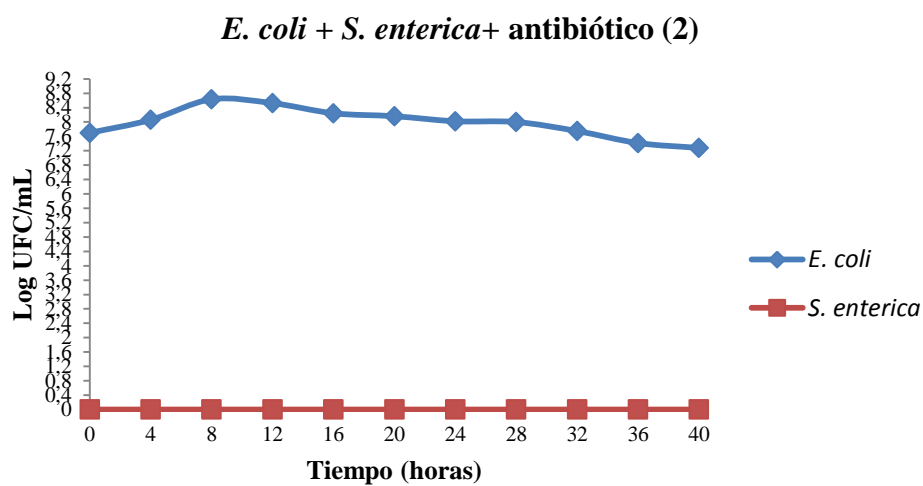
Sin embargo, en los estudios referenciados el tiempo de transformación fue mucho menor (24 horas); esto posiblemente se debe a que existen factores que pueden intervenir en la transferencia de material genético asociado con plásmidos, entre estos se encuentran factores fisiológicos y ambientales que influyen en la expresión de genes de transferencia o mecanismos reguladores que activan o reprimen las vías de transferencia plasmídica, aumentando o disminuyendo la eficiencia de la misma (Frost & Koraimann, 2010).

De acuerdo con esto, Dionisio, Matic, Radman, Rodrigues, & Taddei (2002) & Dimitriu, Misevic, Lindner, & Taddei (2015) establecen que la transferencia plasmídica entre bacterias puede asemejarse a un comportamiento social, en el cual la comunicación celular o *quórum sensing* es un factor clave para que este tipo de procesos se lleven a cabo; de igual manera también se recalca que en poblaciones bacterianas entericas existen sistemas que reprimen la formación de pilis sexuales, pero en presencia de donantes eficientes se puede acelerar la transferencia y propagación de plásmidos en varios órdenes de magnitud, ya que permiten que otras bacterias adquieran el plásmido rápidamente, mientras que, en ausencia de estas cepas, la diseminación del plásmido llevaría años, este efecto ha sido denominado el "efecto de amplificación".

A.



B.



C.

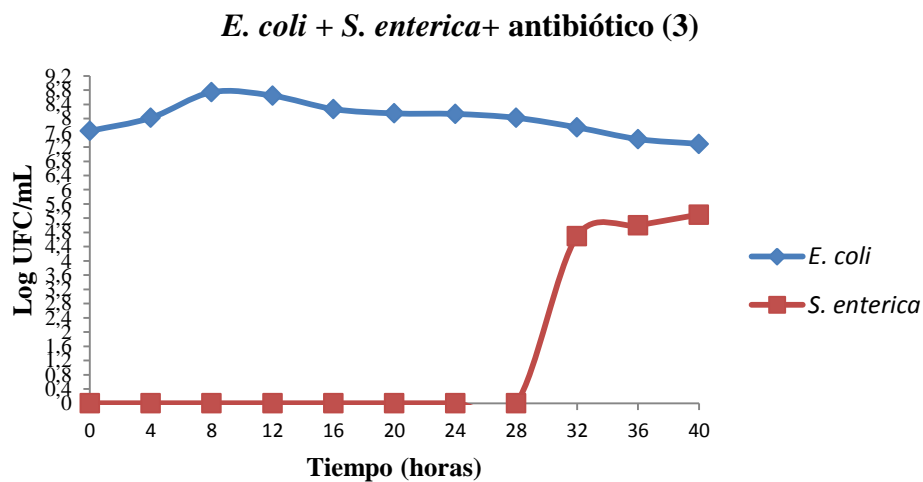
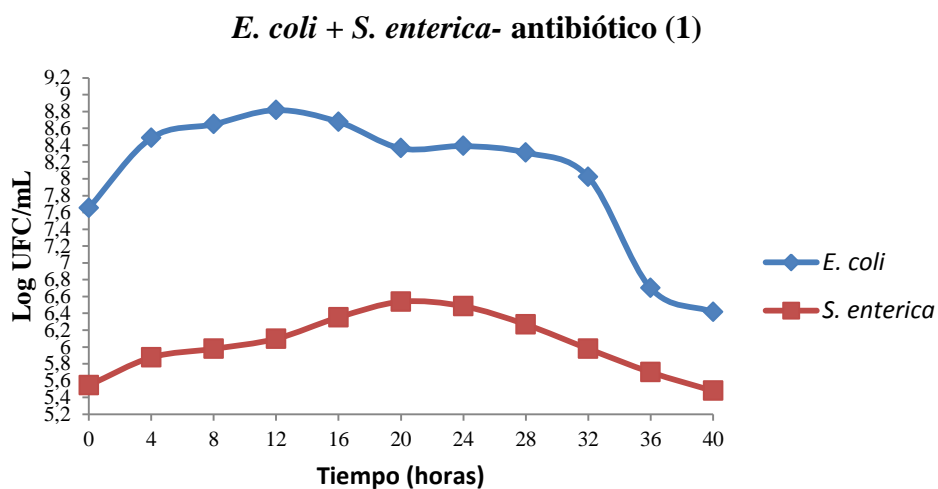


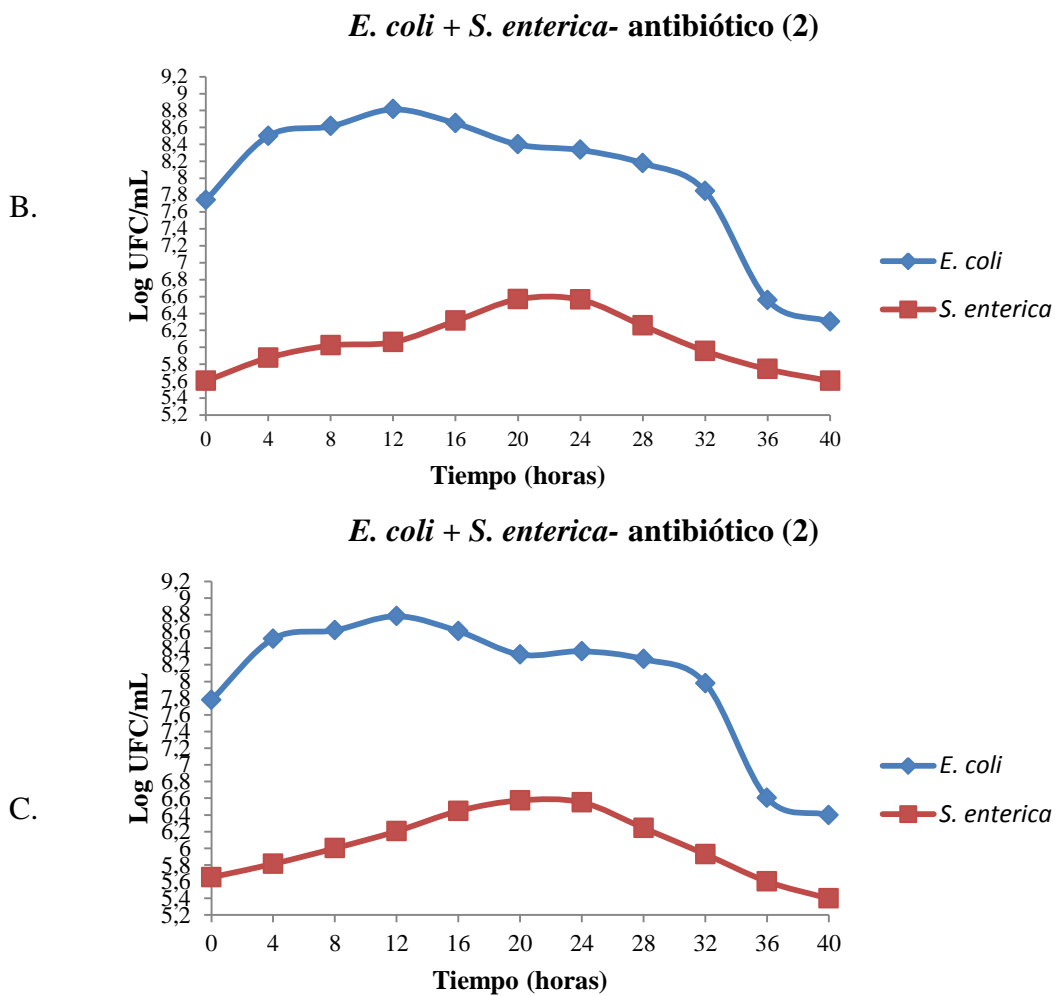
Figura 23. Cinética de crecimiento de *E. coli* y *S. enterica* en presencia de antibiótico (40 horas). A. replica 1; B. replica 2 y C. replica 3. En la imagen se evidencia que, a las 32

horas, se genera el proceso de transformación de la población de *S. enterica*, observando bacterias de *S. enterica* capaces de crecer en un medio de cultivo con antibiótico, fenómeno producto de la interacción de bacterias sensibles vs resistentes - vía adquisición de factores de resistencia. Programa usado Excel.

Fuente: este estudio

A.





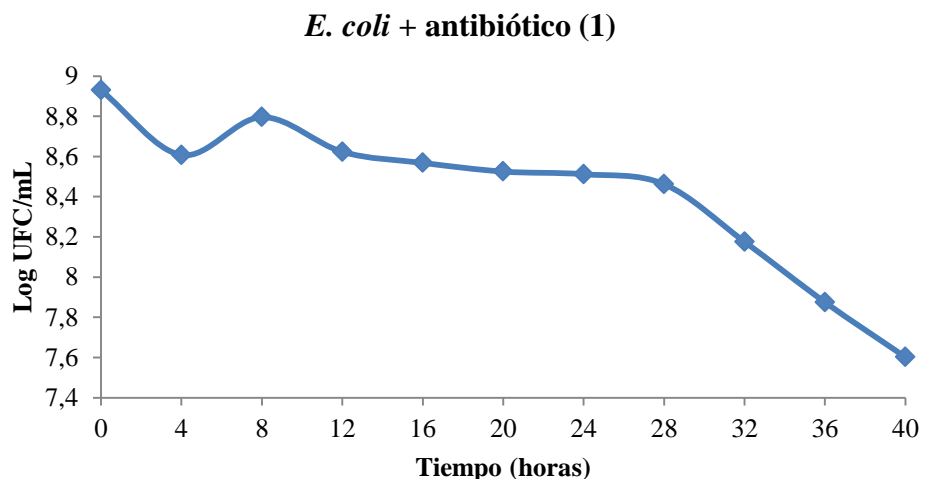
Figura

24.

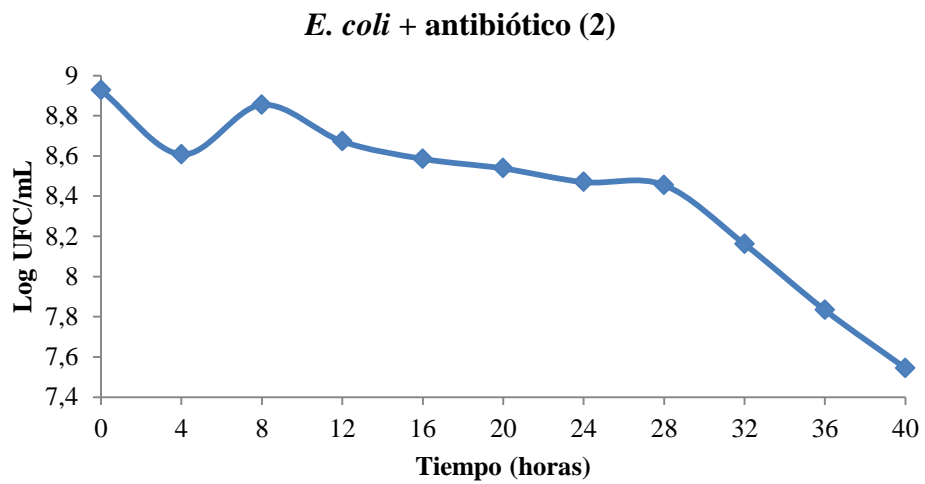
Cinética de crecimiento de *E. coli* y *S. enterica* en ausencia de antibiótico (40 horas). A. replica 1; B. replica 2 y C. replica 3. Programa usado Excel.

Fuente: este estudio

A.



B.



C.

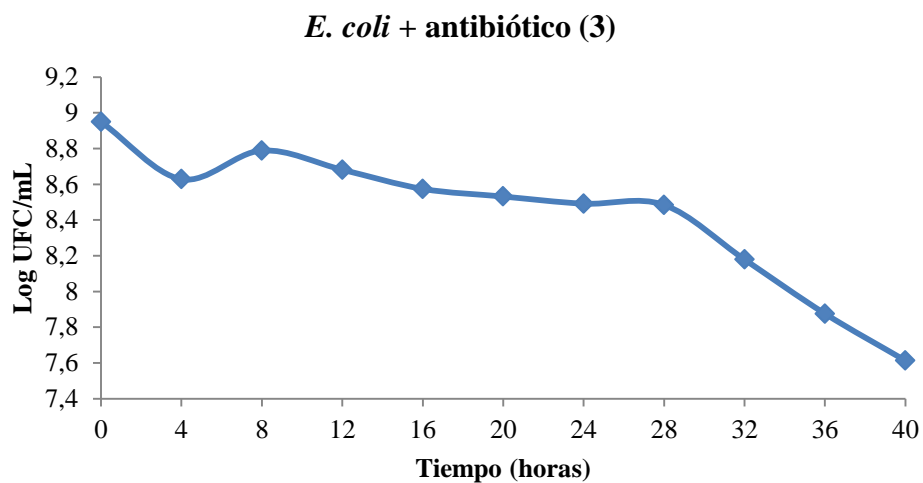


Figura 25. Cinética de crecimiento de *E. coli* en presencia de antibiótico (40 horas). A. replica 1; B. replica 2 y C. replica 3. Este tratamiento fue tomado como control del experimento. Programa usado Excel.

Fuente: este estudio

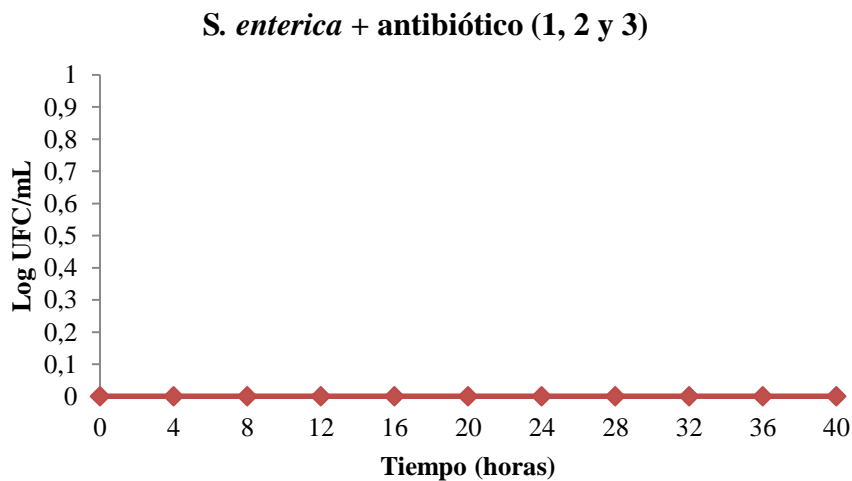


Figura 26. Cinética de crecimiento de *S. enterica* en presencia de antibiótico (40 horas). Las denotaciones 1, 2 y 3 representan las réplicas biológicas. Programa usado Excel.

Fuente: este estudio

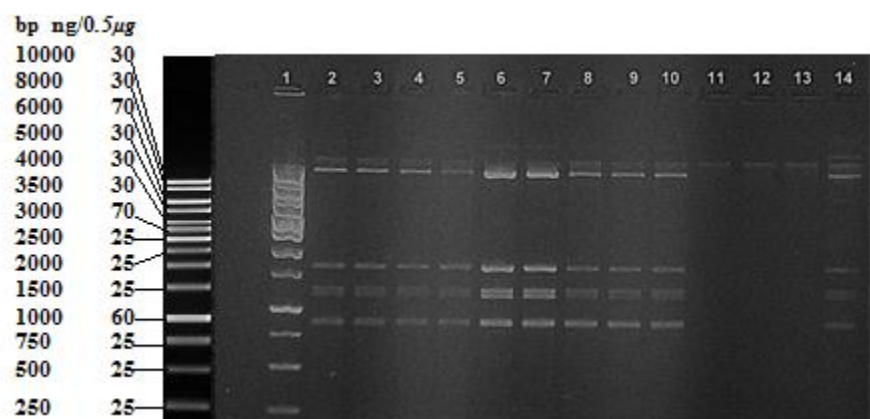


Figura 27. Verificación de la extracción de DNA plasmídico de los tratamientos de transformación. Gel agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos, tratado con el intercalante Gel Red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el primer carril se observa el marcador molecular *1Kb* (Promega); carriles 2, 3 y 4, réplicas de *E. coli* y *S. enterica* con antibiótico; carriles 5, 6 y 7, réplicas de *E. coli* y *S. enterica* sin antibiótico; carriles 8, 9 y 10, réplicas de *E. coli* con antibiótico; carriles 11,12 y 13, réplicas de *S. enterica* con antibiótico y carril 14 colonia de *S. enterica* transformada.

Fuente: este estudio

8.9. Aproximación a la dinámica de transformación mediante modelado matemático

La modelación matemática realizada consistió en: *a)* formular sistemas de ecuaciones diferenciales ordinarias con las principales variables y parámetros involucrados en la cinética de crecimiento de *E. coli* resistente y *S. enterica* sensible, y la transformación vía plasmídica

de una población sensible de *S. enterica*, *b*) estimar a partir de datos experimentales los parámetros involucrados en el modelo e interpretar los resultados a la luz del fenómeno biológico, *c*) simular numéricamente con los valores de los parámetros estimados para predecir el comportamiento de las poblaciones bacterianas, *d*) interpretar el fenómeno de forma integral.

8.9.1. Análisis del modelado de la cinética de crecimiento.

Por medio de la estimación de parámetros se obtuvo un rango de valores para cada uno de los parámetros establecidos (Tabla 11, 12 y 13). Los rangos estimados de los parámetros de crecimiento para la población de *E. coli* resistente en ausencia y presencia del antibiótico fueron 0,07 – 0,17 y 0,09 – 0,19, respectivamente. Se observó que los rangos son similares, ya que la diferencia se encuentra entre 2×10^{-2} ; el rango de la tasa de inhibición del crecimiento bacteriano por parte del antibiótico fue de 0,0006 a 0,0008. Estos resultados indicaron que el antibiótico no ejerce un efecto significativo en la eliminación de bacterias resistentes; no obstante, puede desempeñar un papel de señalización como metabolito secundario generando el desarrollo de variabilidad genética en la población, lo que puede ser favorable para la adaptación a ambientes adversos (Bengtsson-Palme, Kristiansson , & Larsson , 2018).

Tabla 11. Estimación de parámetros para ajuste de curvas de crecimiento *E. coli* sin antibiótico.

Parámetro	Descripción	Unidades	Rango de estimación
K_1^e	Tasa de crecimiento	1/h	0,07 - 0,17
α_2	Parámetro de ajuste	mL/UFC	7,80 - 10,18
d_2^s	Tasa de degradación de	1/(UFC x mL)	0,0003-0,0013

 sustrato

Error promedio estimado: 0,037

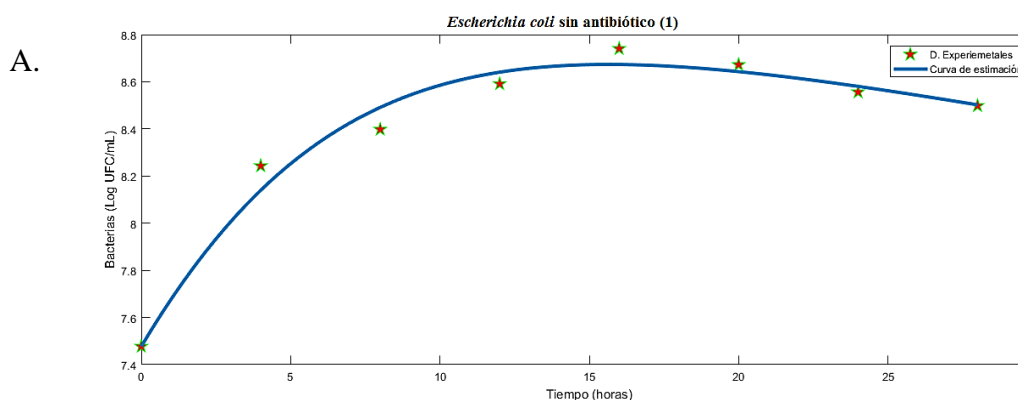
Tabla 12. Estimación de parámetros para ajuste de curvas de crecimiento *E. coli* con antibiótico.

Parámetro	Descripción	Unidades	Rango de estimación
K_2^e	Tasa de crecimiento	1/h	0,09 – 0,19
α_3	Parámetro de ajuste	mL/UFC	8,90 – 10,34
d_2^A	Tasa de degradación de antibiótico	1/ (UFC x mL)	0,03– 0,05
θ_2	Tasa de inhibición de crecimiento bacteriano	1 / (mg x h)	0,0006 – 0,0008
d_4^s	Tasa de degradación de sustrato	1 / (UFC x h)	0,0004 – 0,0007

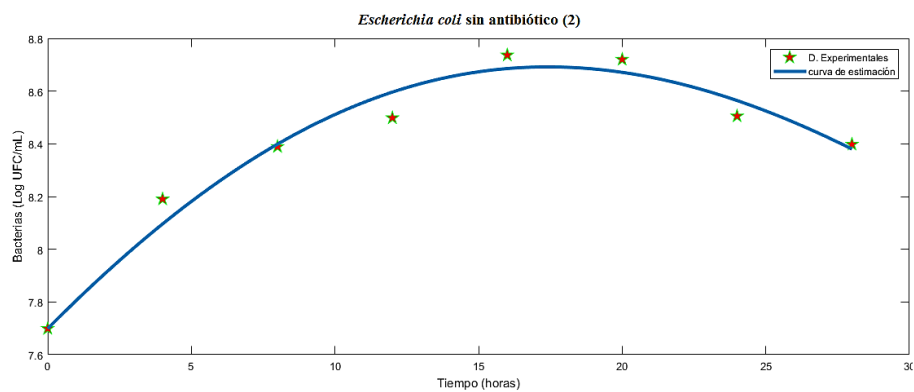
Error promedio estimado: 0,025

Fuente: este estudio

Las cinéticas que se muestran en las figuras 28 y 29 fueron realizadas con los rangos de los parámetros presentados en las tablas 11 y 12, correspondientemente. Estas cinéticas describen el comportamiento de *E. coli* resistente sin y con antibiótico con respecto al tiempo. El ajuste de las curvas de crecimiento se realizó con errores absolutos de 0,037 y 0,025, respectivamente, los cuales se encuentran dentro de los límites de confianza (Hernández, 2005 & Tomas, Cuadros, & Gonzáles, 2006).



B.



C.

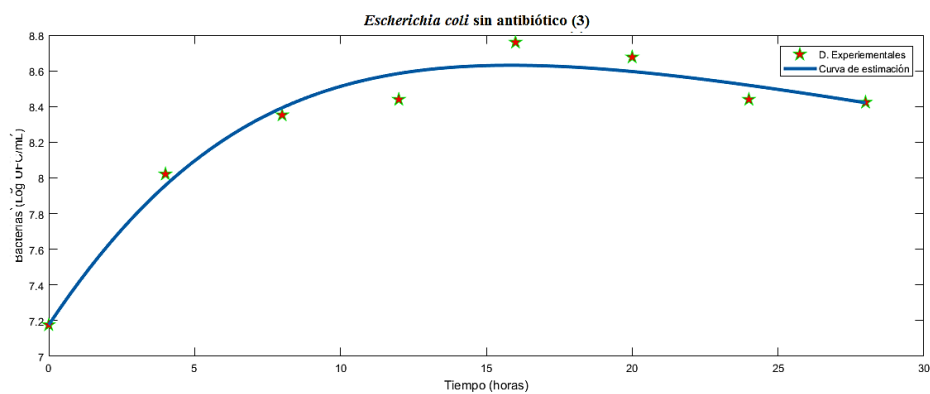
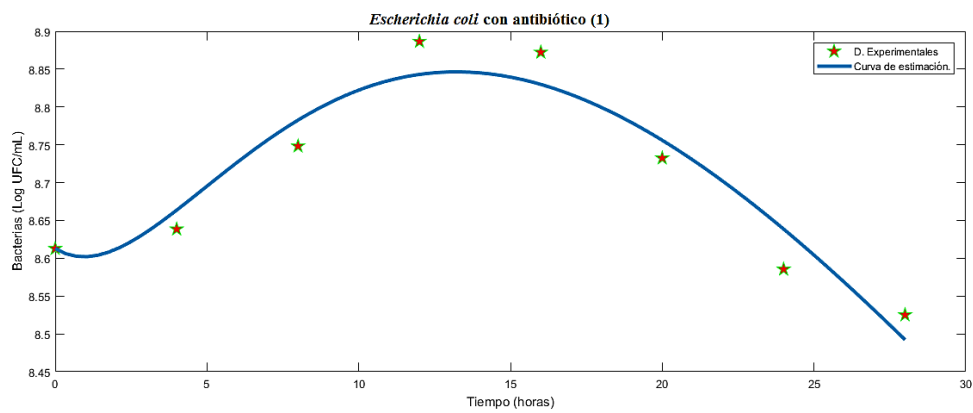


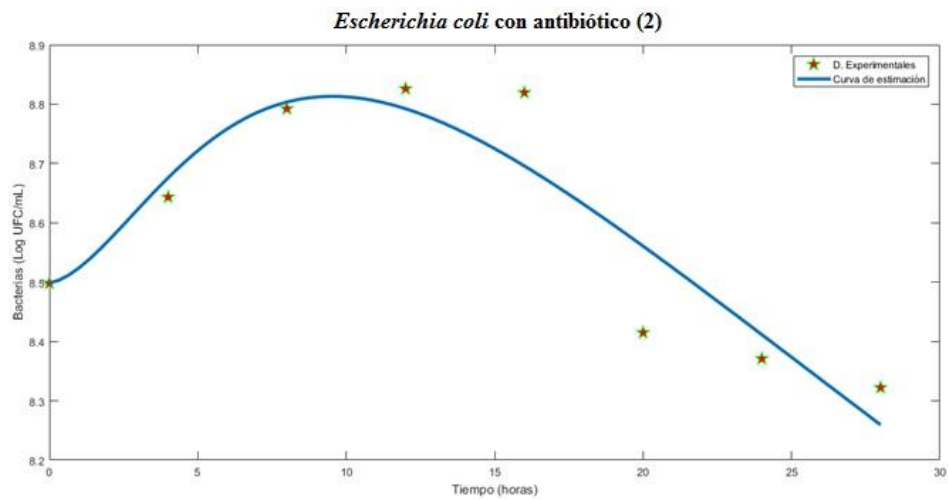
Figura 28. Ajuste de curvas mediante el método de algoritmo genético para poblaciones de bacterias resistentes en ausencia de antibiótico. A. replica 1; B. replica 2 y C. replica 3. Matlab Versión 2015a.

Fuente: este estudio

A.



B.



C.

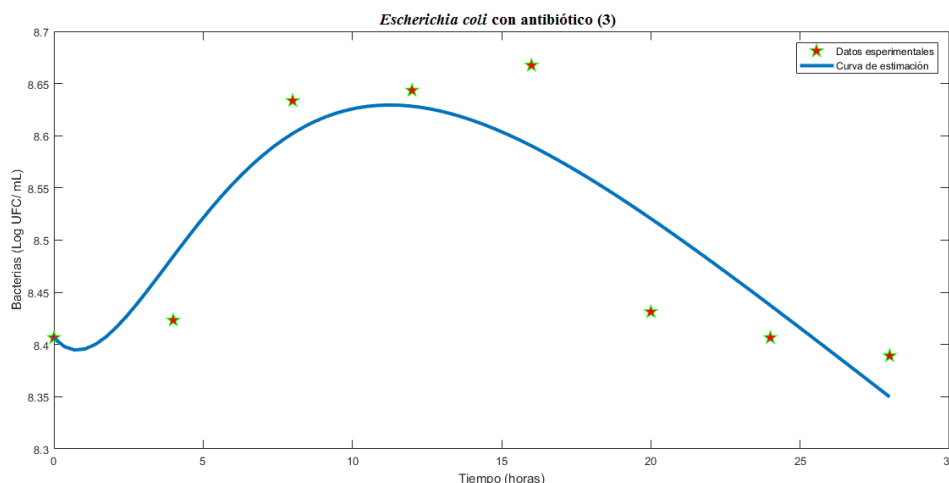


Figura 29. Ajuste de curvas mediante el método de algoritmo genético para poblaciones de bacterias resistentes en presencia del antibiótico. A. replica 1; B. replica 2 y C. replica 3. Matlab Versión 2015a.

Fuente: este estudio

Para la población bacteriana sensible de *S. enterica* en presencia del antibiótico, no se llevó a cabo ninguna simulación matemática, ya que no se evidenció crecimiento en el periodo de tiempo evaluado; en contraste, para la población bacteriana sensible de *S. enterica* en ausencia del antibiótico se obtuvo un rango para la tasa de crecimiento de 0,22 a 0,38 (Tabla 13). La cinética que se indica en la figura 30 fue realizada con los rangos de los parámetros de la tabla 13; el ajuste de las curvas de crecimiento fue realizado con un error de 0,059.

La tasa de crecimiento fue mayor en *S. enterica*, respecto a *E. coli*, esto posiblemente se debe a que a pesar que las dos bacterias pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, cada población bacteriana presenta tasas de crecimiento propias, que dependen de las condiciones

ambientales en las que se encuentren y de la información genética de las mismas, como lo reporta Kirchman (2018) & Koch et al. (2018), estos autores referencian que las tasas de crecimiento pueden cambiar si se evalúan directamente en el ambiente o ecosistema natural en el que se desarrollan estos microorganismos; no obstante, las aproximaciones que se generan a nivel de laboratorio son base fundamental para entender de manera parcial como sería el comportamiento poblacional.

Tabla 13. Estimación de parámetros para ajuste de curvas de crecimiento *S. enterica* sin antibiótico.

Parámetro	Nombre	Unidades	Rango de estimación
K_1^s	Tasa de crecimiento	1/h	0,22 - 0,38
α_1	Parámetro de ajuste	mL/UFC	7,35 - 10,95
μ_1^s	Tasa de muerte natural	1/h	0,0074 - 0,096
d_1^s	Tasa de degradación de sustrato	1 / (UFC x h)	0,0004 - 0,0008
Error promedio estimado: 0.059			

Fuente: este estudio

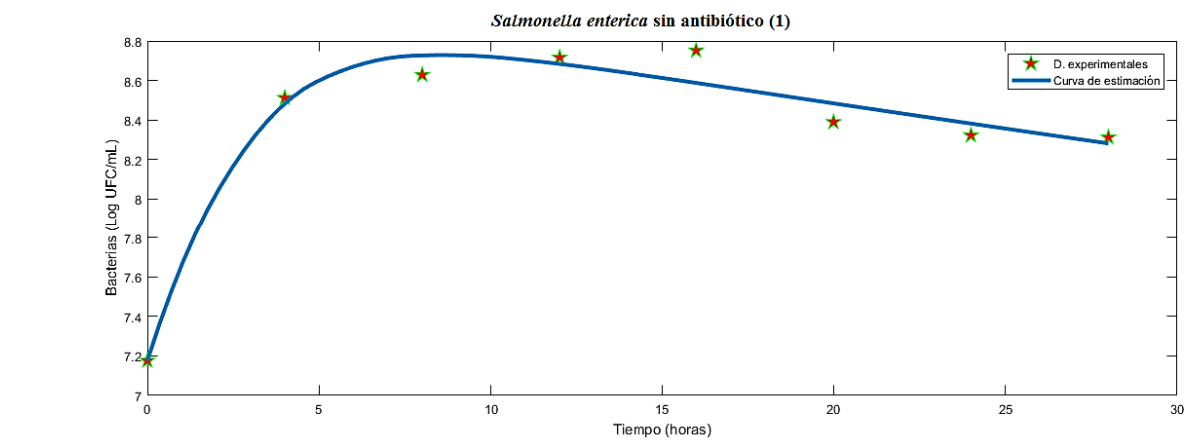
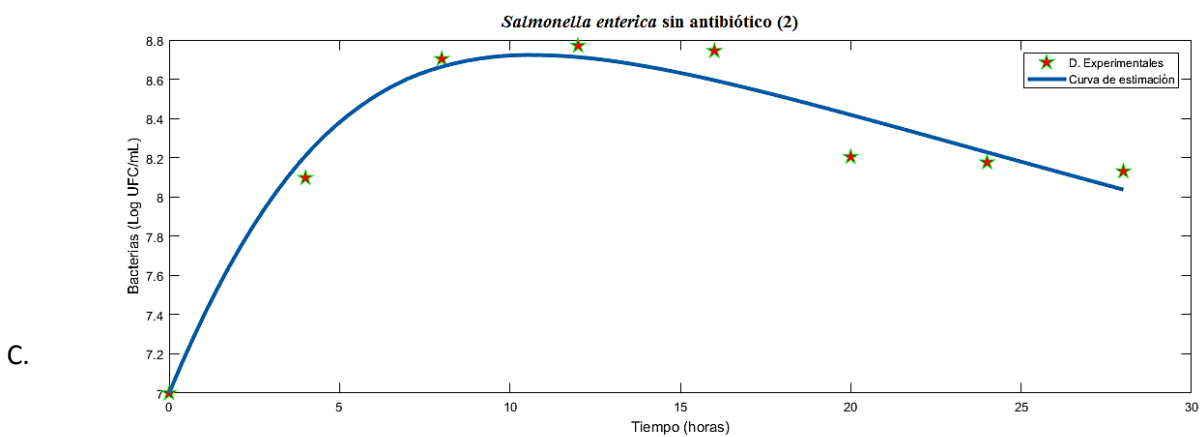
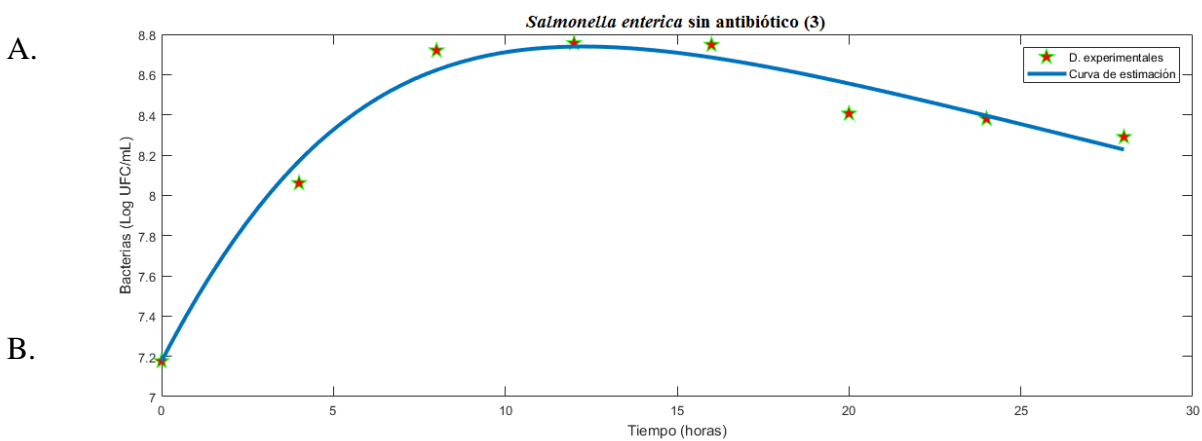


Figura 30. Ajuste de curvas mediante el método de algoritmo genético para poblaciones de bacterias sensibles en ausencia del antibiótico. A. replica 1; B. replica 2 y C. replica 3. Matlab Versión 2015a.

Fuente: este estudio

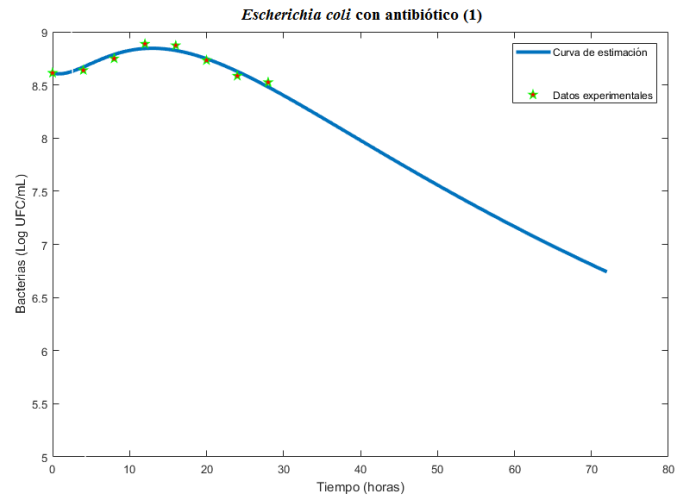
Las cinéticas de las figuras 31, 32 y 33 fueron simuladas numéricamente a partir de los rangos de los parámetros previamente establecidos, a diferencia de las cinéticas anteriores, estas se realizaron hasta un tiempo de 72 horas, con el propósito de predecir el comportamiento poblacional y verificar si existen cambios significativos en un periodo más prolongado. En este periodo de tiempo se determinó que tanto *E. coli* resistente como *S. enterica* sensible decrecieron a medida que incrementó el tiempo hasta una población promedio de 6,82 log UFC/mL para *E. coli* resistente en presencia de antibiótico, 6,95 log UFC/mL para *E. coli* resistente en ausencia de antibiótico y 6,71 log UFC/mL para *S. enterica* en ausencia de antibiótico (Tabla 14); además, se resalta que la disminución de las poblaciones bacterianas no es tan significativa respecto al tiempo y los rangos observados entre ellas.

Tabla 14. Predicción de crecimiento de poblaciones resistentes de *E. coli* y sensibles de *S. enterica*.

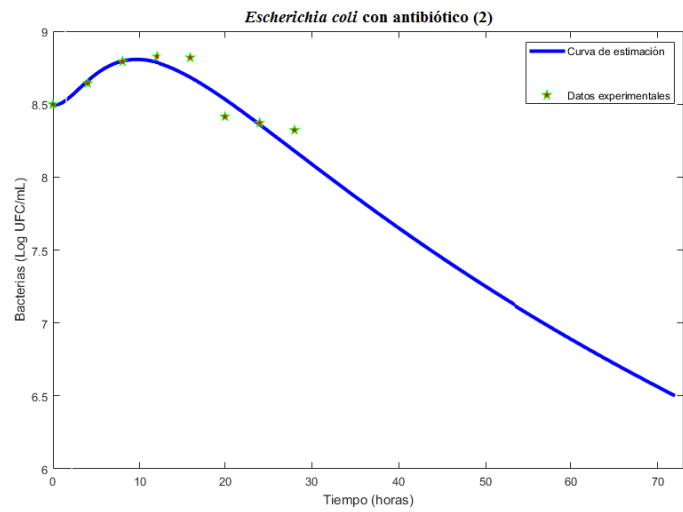
Población	Población inicial (Log UFC/mL)	Predicción de crecimiento a 72 horas (Log UFC/mL)
<i>E. coli</i> en presencia de antibiótico replica 1	8,6	6,74
<i>E. coli</i> en presencia de antibiótico replica 2	8,5	6,50
<i>E. coli</i> en presencia de antibiótico replica 3	8,4	7,23
<i>E. coli</i> en ausencia de antibiótico replica 1	7,5	7,68
<i>E. coli</i> en ausencia de antibiótico replica 2	7,7	5,81
<i>E. coli</i> en ausencia de antibiótico replica 3	7,2	7,36
<i>S. enterica</i> ausencia de antibiótico replica 1	7,2	7,17
<i>S. enterica</i> ausencia de antibiótico replica 2	7	6,23
<i>S. enterica</i> ausencia de antibiótico replica 3	7,3	6,73

Fuente: este estudio

A.



B.



C.

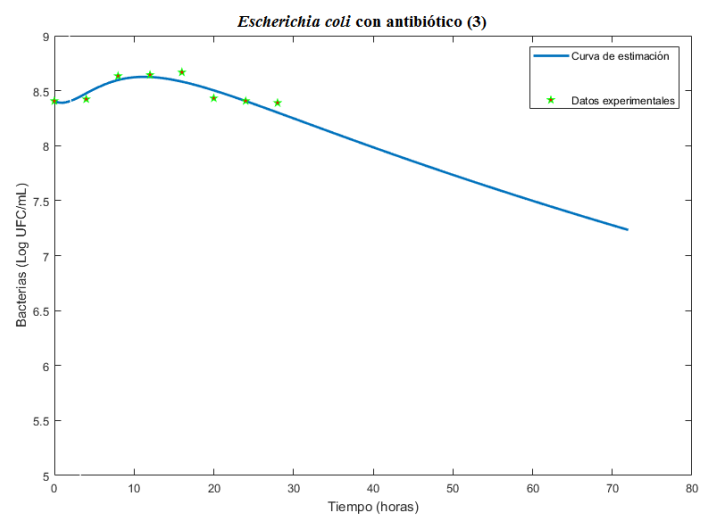
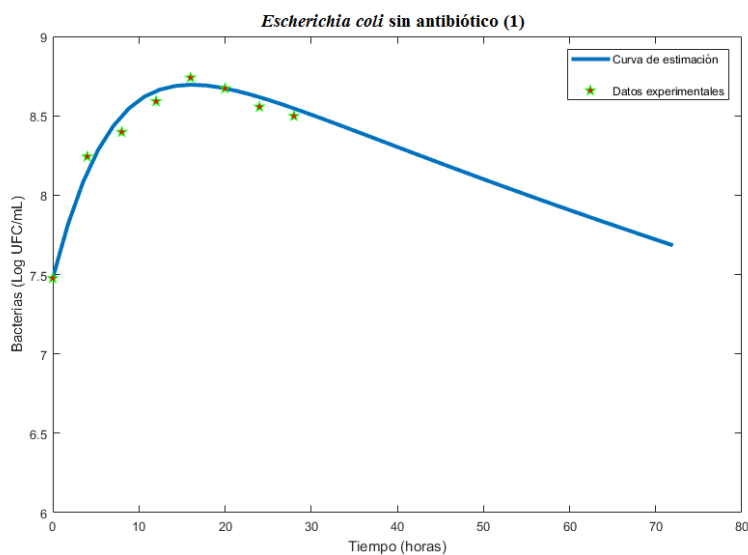


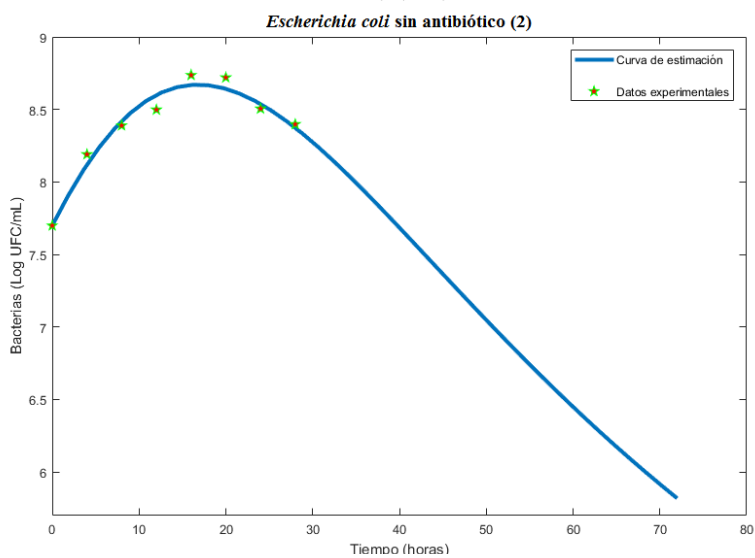
Figura 31. Predicción matemática de la cinética de crecimiento de *E. coli* resistente en presencia de antibiótico a las 72 horas. A. replica 1; B. replica 2 y C. replica 3. Matlab Versión 2015a.

Fuente: este estudio

A.



B.



C.

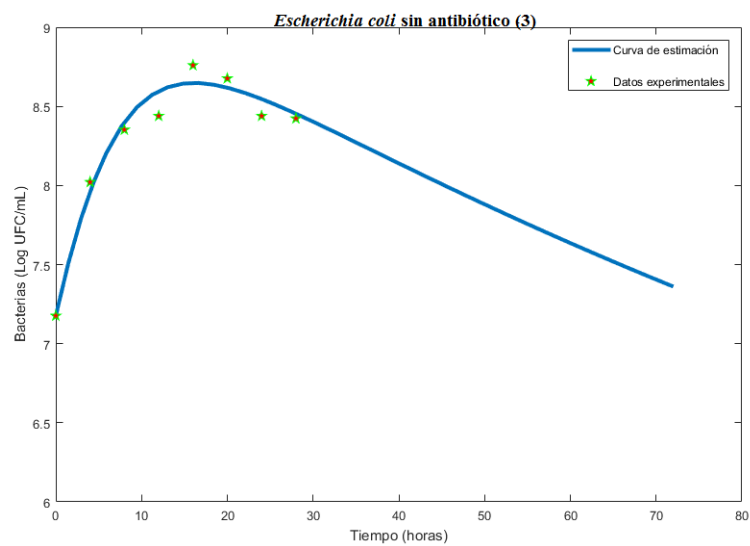
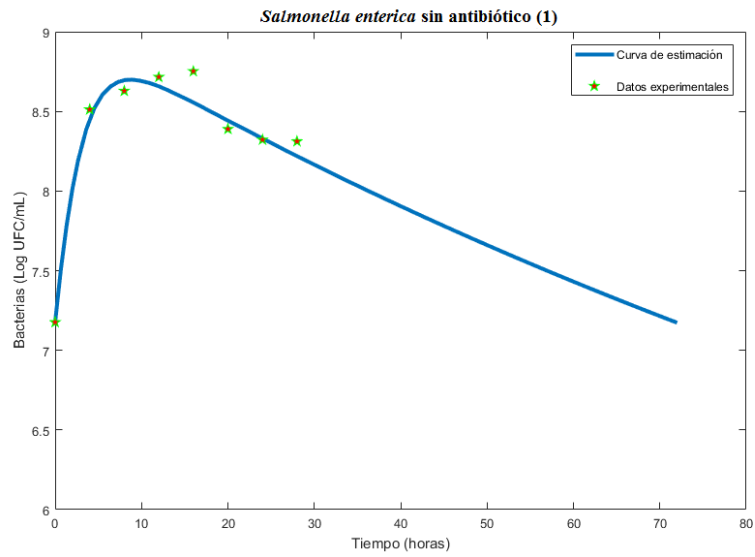


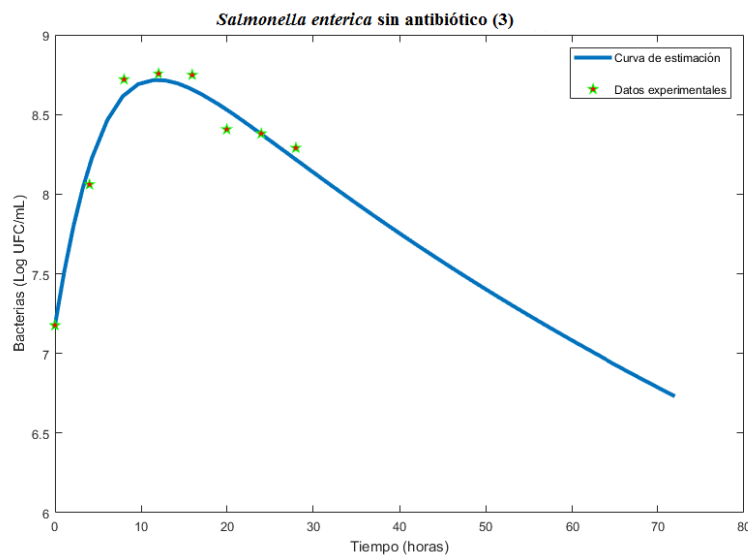
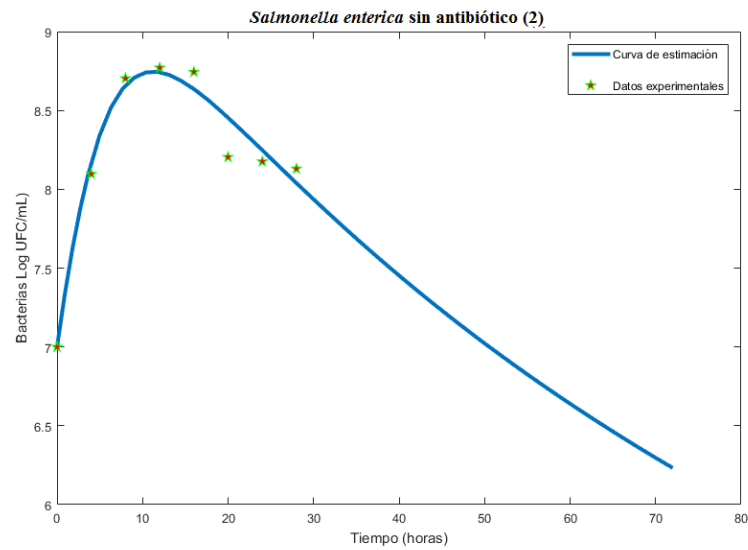
Figura 32. Predicción matemática de la cinética de crecimiento de *E. coli* resistente en ausencia de antibiótico a las 72 horas. A. replica 1; B. replica 2 y C. replica 3. Matlab Versión 2015a.

Fuente: este estudio

A.



B.



C.

Figura 33. Predicción matemática de la cinética de crecimiento de *S. enterica* sensible en ausencia de antibiótico a las 72 horas. A. replica 1; B. replica 2 y C. replica 3. Matlab Versión 2015a.

Fuente: este estudio

Los resultados obtenidos a partir del modelado matemático para la cinética de crecimiento para *E. coli* y *S. enterica* son consecuentes con el fenómeno biológico y coinciden con investigaciones desarrolladas por varios autores, como es el caso del trabajo desarrollado por Ternent, Dyson, Krachler, & Jabbari (2015) quienes evaluaron la dinámica poblacional de bacterias resistentes y sensibles frente a un tratamiento con antibióticos y anti-virulencia a nivel matemático; sus modelos predicen que bajo diferentes dosis de antibióticos la población sensible es erradicada completamente; sin embargo, a medida que se degrada el antibiótico la población de bacterias resistentes aumentó exponencialmente y cuando el antibiótico es administrado constantemente las bacterias resistentes permanecían en un estado de equilibrio. Por otro lado, Krzyzanski & Rao (2017) formularon un modelo multiescala de resistencia adaptativa en bacterias Gram negativas y determinaron que la eficacia máxima de polimixina B, fue aproximadamente seis veces mayor para una cepa de *K. pneumoniae* sensible que, para una cepa más resistente, también se predijo que la afinidad del antibiótico

con la diana y la concentración son factores determinantes para el desarrollo de una población bacteriana resistente.

En este sentido, las simulaciones numéricas presentaron un comportamiento similar a lo observado por Ternent, Dyson, Krachler, & Jabbari (2015) cuando el antibiótico es suministrado al inicio y por Krzyzanski & Rao (2017) cuando la población bacteriana sensible es erradicada completamente por acción del antibiótico.

Las predicciones realizadas en este trabajo pueden compararse con el estudio realizado por Nguyen et al. (2014) quienes desarrollaron un modelo matemático de la cinética de enterobacterias resistentes, con el fin de predecir el impacto de la exposición a un antibiótico usado para infecciones del colon; en esta investigación se concluyó mediante predicciones matemáticas que la cantidad de enterobacterias resistentes aumentó respecto a diferentes concentraciones de antibióticos, en contraste las cepas susceptibles se eliminaron rápidamente y una vez finalizado el tratamiento, las enterobacterias resistentes desaparecieron lentamente (2 y 15 días). Las simulaciones de esta investigación coinciden parcialmente con lo observado, debido a que se evidenció un decrecimiento relativamente lento.

A partir de los resultados obtenidos en este estudio, se evidencia que los modelos matemáticos propuestos para poblaciones de bacterias resistentes y sensibles pueden describir de manera confiable las cinéticas de crecimiento de cada una de ellas, puesto que los errores obtenidos se encuentran por debajo de 10% y se logró observar el comportamiento típico de crecimiento bacteriano; además estos resultados pueden servir de base para diseñar y evaluar nuevas estrategias que pretendan ejercer una acción específica sobre bacterias resistentes, reduciendo el desarrollo y diseminación de resistencia en la comunidad.

8.9.2. Simulación numérica y análisis de resultados para transformación plasmídica

Por medio de la estimación se obtuvo un rango de valores para cada uno de los parámetros establecidos. A partir de los datos de la cinética de crecimiento se calcularon valores estimados para algunos de los parámetros y se conservaron valores fijos: K_3^e , K_3^s , μ_3^e y μ_3^s (Tablas 15 y 16); se observó un tasa de transformación de 0,02, entendida como la población de *S. enterica* sensible que se encuentra en el proceso de adquisición y regulación del plásmido, pero no se expresa la resistencia a nivel fenotípico; la tasa de muerte de *S. enterica* sensible por acción del antibiótico fue de 0,93, lo que indica un alto grado de efectividad del antibiótico respecto a esta población, dicho parámetro concuerda con la proporción del antibiótico en el medio (0,77); También es de resaltar que la tasa de degradación del plásmido por procesos naturales fue muy pequeña 0,0012, esto se relaciona directamente con la tasa de crecimiento de la población resistente.

Las cinéticas que se muestran en la figura 34 fueron realizadas con los rangos de los parámetros presentados en las tablas 15 y 16. Estas cinéticas describen el comportamiento de *E. coli* resistente y *S. enterica* sensible relacionado con el tiempo. El ajuste de las curvas de crecimiento se realizó con un error relativo de 0,1, lo que indica que el modelo explica parcialmente el fenómeno biológico (Hernández, 2005 & Tomas, Cuadros, & Gonzáles, 2006).

Esta primera etapa del proceso de transformación muestra de alguna manera la fase de adaptación de la población sensible, que logra sobreponerse a las condiciones del medio; diferentes estudios relacionan que antes de que suceda la transformación bacteriana

intervienen diferentes factores como: la comunicación celular, los mecanismos de regulación de transferencia, sistemas que activan o reprimen la formación de pilis, condiciones del medio, acoplamiento y regulación del plásmido (Bengtsson-Palme, Kristiansson & Larsson , 2018; Dimitriu, Misevic, Lindner, & Taddei, 2015 & Frost & Koraimann, 2010;).

Tabla 15. Parámetros fijos obtenido de la cinética de crecimiento.

Parámetro	Nombre	Valor	Unidades
K_3^e	Tasa de crecimiento de <i>E. coli</i>	0.35	1/h
K_3^s	Tasa de crecimiento de <i>S. enterica</i> sensible	0.11	1/h
μ_3^e	Tasa de muerte natural de <i>E. coli</i>	1/72	1/h
μ_3^s	Tasa de muerte natural de <i>S. enterica</i>	0.0964	1/h
n_1	Número de copias del plásmido	2	Copias (h x UFC)
ε_r	Tasa de consumo de medio de población de <i>E. coli</i>	0.0004	1/hora x UFC
ε_s	Tasa de consumo de medio de población de <i>S. enterica</i>	0.0002	1/hora x UFC

Fuente: este estudio

Tabla 16. Estimación de parámetros para ajuste de curvas de transformación hasta las 28 horas.

Parámetro	Nombre	Valor	Unidades
α_4	Parámetro de ajuste	13.31	mL/UFC
γ_1	Tasa de transformación	0.0218	1/ (número de copias x hora)
β_2	Tasa de muerte por acción del antibiótico	0.93	1/mg x hora
μ_1^p	Tasa de degradación del plásmido	0.0012	1/h
M_1	Proporción de antibiótico respecto al sustrato	0.77	

Fuente: este estudio

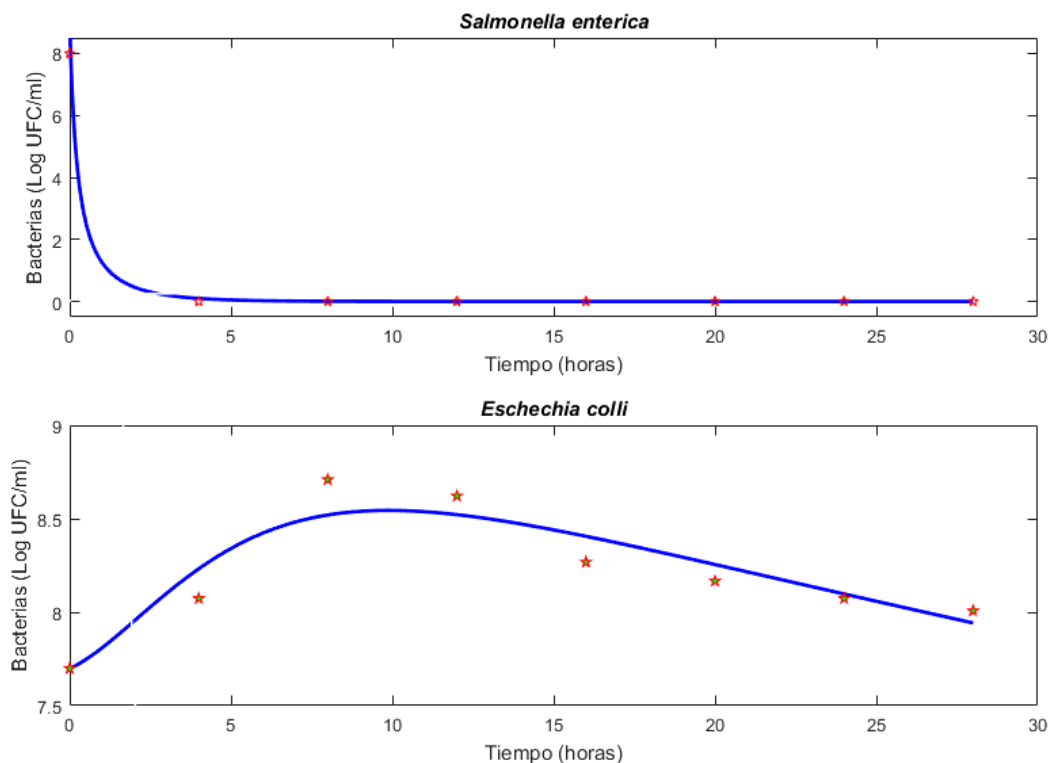


Figura 34. Ajuste de curvas mediante el método de algoritmo genético para proceso de transformación hasta las 28 horas. Matlab Versión 2015a.

Fuente: este estudio

En la segunda etapa del proceso de transformación se evidenció una mayor tasa de crecimiento de *S. entérica* resistente K_2^T (0,64) respecto a la tasa de crecimiento de *E. coli* resistente, además se observó una tasa de transformación de 0,86, lo que indica un aumento considerable en la población transformada después de las 28 horas; por lo tanto, se infiere que

a medida que transcurra el tiempo la mayoría de la población de *S. entérica* sensible será transformada en resistente.

Las cinéticas que se muestran en la figura 35 fueron realizadas con los rangos de los parámetros presentados en la tabla 17. Estas cinéticas describen el comportamiento de *E. coli* resistente y *S. enterica* resistente y el proceso de transformación relacionados con el tiempo. El ajuste de las curvas de crecimiento se realizó con un error relativo de 0,5, lo que indica que el modelo explica significativamente el fenómeno biológico (Hernández, 2005 & Tomas, Cuadros, & Gonzáles, 2006).

Tabla 17. Estimación de parámetros para ajuste de curvas de transformación hasta las 40 horas.

Parámetro	Nombre	Valor	Unidades
K_2^r	Tasa de crecimiento de <i>S. enterica</i> resistente	0,64	1/h
α_4	Parámetro de ajuste	40,14	mL/UFC
γ_1	Tasa de transformación	0.86	1/ (número de copias x hora)
μ_2^r	Tasa de muerte natural de <i>S. entérica</i> resistente	0.00012	1/h
ϵ_s	Tasa de consumo de medio de población de <i>S. entérica</i> resistente	0.77	1/ (hora x UFC)

Fuente: este estudio

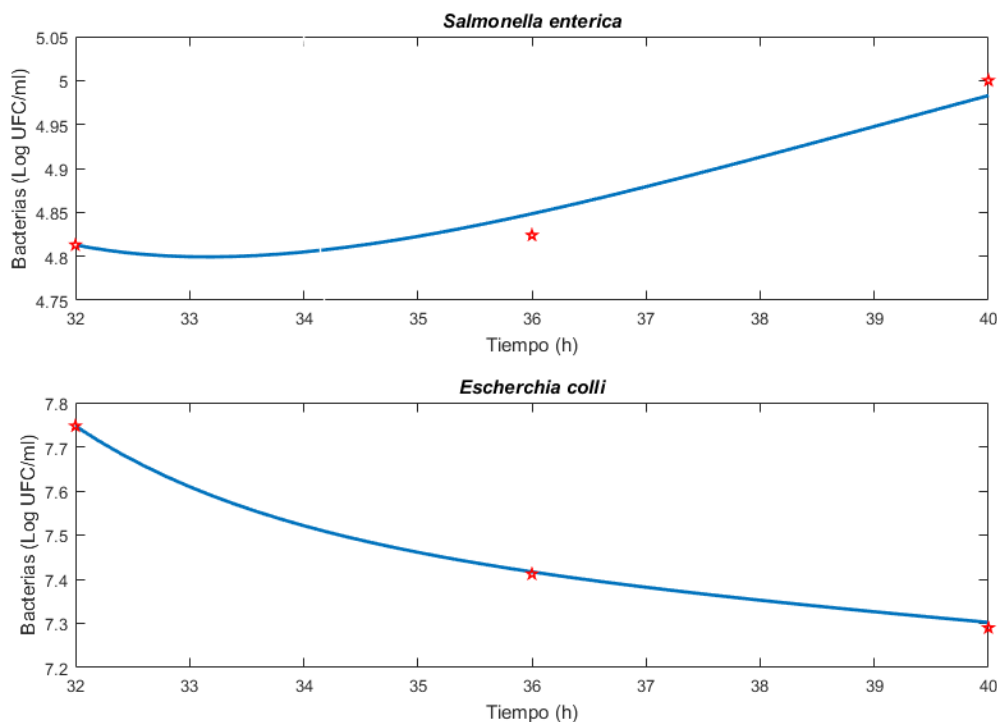


Figura 35. Ajuste de curvas mediante el método de algoritmo genético para proceso de transformación hasta las 40 horas. Matlab Versión 2015a.

Fuente: este estudio

Estudios parcialmente similares fueron propuestos por Nazarian, Tran & Boedicker (2018), quienes evaluaron modelos matemáticos teóricos que describían la dinámica de diferentes mecanismos de transferencia horizontal, entre estos la transformación mediada por plásmidos conjugativos; estos autores concluyeron que la transferencia de un plásmido conjugativo es muy rápida, con una propagación total en menos de 30 días, asumiendo una homogeneidad a nivel espacial, también se determinó que en esta dinámica existen barreras

como el mantenimiento y la fijación del gen transferido, sistemas de modificación-restricción e interferencia y presión de selección.

De igual manera Mao & Lu (2016), desarrollaron un modelo matemático dinámico que describió la transformación natural bacteriana y demostraron que las poblaciones resistentes y sensibles pueden presentar diferentes comportamientos como la extinción, convivencia y bioestabilidad, teniendo en cuenta el coeficiente de selección del medio, ya que como lo reporta Paterson, Hoyle, Ochoa, Baker-Austin & Taylor (2016) en sus modelos matemáticos, un factor importante que ejerce una presión de selección de cepas resistentes e incide en el proceso de transformación, es el uso excesivo de antibióticos. Es importante destacar que en los modelos mencionados con anterioridad se fijaron tasas de coste biológico para la bacteria receptora; parámetro que no fue tomado en cuenta en nuestro análisis y puede generar resultados más aproximados al fenómeno biológico.

9. Conclusiones

Los aislados clínicos de *E. coli* presentaron una resistencia marcada a la mayoría de antibióticos empleados en el estudio, esta resistencia (P, SXT, CIP, AMX, AMC y GN) puede estar relacionada con el uso habitual de estos antibióticos para contrarrestar infecciones urinarias en la ciudad de San Juan de Pasto.

Los aislados de *E. coli* (16) presentaron perfiles plasmídicos de uno a cinco bandas con tamaños moleculares de 0,9 a 18,7 Kb, fragmentos que se encontraban directamente asociados con los genes de resistencia: *bla*TEM, *bla*SHV1 y *bla*CTXM1.

Los aislados de *E. coli* (13) presentaron genes de resistencia tipo, *bla*CTXM1, *bla*TEM, *FosA*, *Mcr -1* y *bla*SHVI en DNA cromosomal, lo que indica que estos factores de virulencia se están integrando en la información genética.

Los estados clonales generados por el marcador *ERIC-PCR* (100% de similaridad), demuestran características de patogenicidad idénticas vinculadas a la infección urinaria reportada en la ciudad de San Juan de Pasto.

El Modelo Lineal General (MLG) se acopló al fenómeno biológico de estudio, explicando 99,2 % de la variabilidad en los datos de la cinética de crecimiento y evidenciando una relación altamente significativa (p- valor: 0,0000) entre el crecimiento y el antibiótico y tipo de cepa bacteriana.

Se concluye que existe una relación débil de asociación positiva entre las poblaciones bacterianas (sensibles y resistentes); generando una tasa de transformación en el orden de $7,8 \times 10^{-4}$ y $5,2 \times 10^{-3}$ a las 32 y 40 horas, correspondientemente.

Los modelos matemáticos propuestos para las cinéticas de crecimiento y transformación describen de manera confiable la dinámica de cada fenómeno biológico, generando escenarios predictivos para posteriores análisis y desarrollos de estrategias que ejerzan una acción sobre el incremento de bacterias resistentes.

10. Recomendaciones

Generar un estudio comparativo de la resistencia bacteriana en diferentes establecimientos de Salud en la ciudad de San Juan de Pasto, teniendo en cuenta aspectos del paciente como: sexo, edad, escolaridad, núcleo familiar, uso de antibióticos, entre otros.

Analizar el genoma bacteriano y el perfil de los plásmidos que presenten genes de resistencia, información relevante relacionada con el mecanismo de adquisición de resistencia.

Emplear otros marcadores moleculares, con el fin de establecer la diseminación de los microorganismos infecciosos (*E. coli*) en poblaciones específicas (pacientes con infecciones urinarias) en la ciudad de San Juan de Pasto.

Evaluar a nivel experimental el proceso de transformación en un periodo de tiempo más prolongado, con el objetivo de definir como se está generando específicamente dicho mecanismo.

Implementar un modelo matemático de transformación con retardo, teniendo en cuenta el fitness bacteriano, como factor importante para la dinámica.

Generar un modelo de control óptimo que permita definir qué factores pueden incidir en la progresión de la resistencia bacteriana.

11. Bibliografía

Adiguzel, A., Ozkan, H., Baris, O., Inan, K., Gulluce, M., & Sahin, F. (2009). Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. *Journal of microbiological methods*, 79(3), 321-328.

Alós, J. I. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 33(10), 692-699.

Alrowais, H., McElheny, C. L., Spychala, C. N., Sastry, S., Guo, Q., Butt, A. A. (2015). Fosfomicin resistance in *Escherichia coli*, Pennsylvania, USA. *Emerging infectious diseases*, 21(11), 2045.

Álvarez-Hernández, D., Garza-Mayén, G., & Vázquez-López, R. (2015). Quinolonas: Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. *Revista chilena de infectología*, 32(5), 499-504.

Alviz-Amador, A., Gamero-Tafur, K., Caraballo-Marimon, R., & Gamero-Tafur, J. (2018). Prevalencia de infección del tracto urinario, uropatógenos y perfil de susceptibilidad en un hospital de Cartagena, Colombia. 2016. *Revista de la Facultad de Medicina*, 66(3), 313-317.

Angles, E. (2018). Uso racional de antimicrobianos y resistencia bacteriana: ¿hacia dónde vamos? *Revista Medica Herediana*, 29(1), 3-4.

Arce-Gil, Z., Llontop-Nuñez, J., FloresClavo, R., & Fernández Valverde, D. (2013). Detección del gen CTX-M en cepas de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido procedentes del Hospital Regional de Lambayeque. *cuero med*, 6(4), 13-16.

Arce-Gil, Z., Llontop-Nuñez, J., Flores-Clavo, R., & Fernández-Valverde, D. (2015). Detección del gen CTX-M en cepas de *Echerichia coli* productoras de B-lactamasas de espectro extendido procedentes del Hospital Regional de Lambayeque; Chiclayo-Perú: Noviembre 2012-Julio 2013. *Cuerpo Med*, 6(4), 13-16.

Argente, M., Miró, E., Martí, C., Vilamala, A., Alonso-Tarrés, C., Ballester, F., et al. (2019). Molecular characterization of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains after a carbapenem resistance increase in Catalonia. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 37(2), 82-88.

Asimbaya, D. X. (Abril de 2016). Factores clínicos asociados a multirresistencia bacteriana en el hospital de especialidades de las fuerzas armadas n1 en el periodo enero-septiembre 2015. *Factores clínicos asociados a multirresistencia bacteriana en el hospital de especialidades de las fuerzas armadas n 1 en el periodo enero-septiembre 2015*. Quito, Ecuador.

Auqui, R. (Febrero de 2016). Resistencia bacteriana en urocultivos en pacientes del área de hospitalización del Hospital Un canto a la vida padre Carolo en el periodo comprendido entre enero 2012 a diciembre 2013 (tesis). 9-11. Quito.

Baker, M., Hobman, J. L., Dodd, C. E., Ramsden, S., & Stekel, D. J. (2016). Mathematical modelling of antimicrobial resistance in agricultural waste highlights importance of gene transfer rate. *FEMS microbiology ecology*, 92(4), 40.

Barba, P., Paredes, D., Yauri, M. F., Riglos, M. R., Zurita, J., & Alcocer, I. (2017). Detección de genes codificantes de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMAs) en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 33(1), 46-56.

Barrero, L. I., Castillo, J. S., Leal, A., Sánchez, R., Cortés, J. A., Álvarez, C. A., et al. (2014). Impacto económico de la resistencia a la meticilina en pacientes con bacteriemia por *Staphylococcus aureus* en hospitales de Bogotá. *Biomédica*, 34(3).

Becerra, V., & Paredes, M. (2000). Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura Técnica*, 60(3), 270-281.

Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., & Larsson, D. (2018). Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *Microbiol Rev*, 42(1), 68-79.

Bergey, D. H., & Holt, J. G. (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology (Novena ed.). Maryland, EUA: Lippincott Williams and Wilkins.

Betancor, L., Gadea, M., & Flores, K. (2014). Genética bacteriana (temas de bacteriología y virología medica). 59-65.

Birgy, A., Madhi, F., Hogan, J., Doit, C., Gaschignard, J., Caseris, M., y otros. (2018). CTX-M-55-, MCR-1-, and FosA-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* infection in a child in France. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62(4), 127-18.

- Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, O., & Piddock, L. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(1), 42-51.
- Blanc, V., Llagostera, M., & Cortes, M. P. (2008). Caracterización de cepas y de plásmidos de *Enterobacteriaceae* portadores de beta-lactamasas de espectro extendido. *Universidad Autónoma de Barcelona*.
- Blanco, V. M., Maya, J. J., Correa, A., Perenguez, M., Muñoz, J. S., Mota, G., et al. (2016). Prevalencia y factores de riesgo para infecciones del tracto urinario de inicio en la comunidad causadas por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido en Colombia. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, *34*(9), 559-565.
- Boisen, N., Krogfelt, K. A., & Nataro, J. P. (2013). *Chapter 8 Enteroaggregative Escherichia coli*. In: *Escherichia coli* (Second ed.). Academic Press.
- Bosilevac, J., & Koohmaraie, M. (2011). Prevalence and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from commercial ground beef in the United States. *Applied and environmental microbiology*, *77*(6), 2103-2112.
- Bravo, G. G. (2009). Deteccion de la mutacion T315I de ABL1, asociada a la resistencia a Imatinib, Dasatinib y Nilotinib en la Leucemia Mieloide Cronica.
- Brosius, J., Dull, T. J., Sleeter, D. D., & Noller, H. (1981). Gene organization and primary structure of ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Bio*, (148), 107-127.
- Bryce, A., Hay, A. D., Lane, I. F., Thornton, H. V., Wootton, M., & Costelloe, C. (2016). Global prevalence of antibiotic resistance in paediatric urinary tract infections caused by *Escherichia coli* and association with routine use of antibiotics in primary care: systematic review and meta-analysis. *bmj*, 352 - i939.
- Burbano- Rosero, M., Caetano de Almeida, B., & Otero-Ramírez, I. (2017). Manual de Biología Molecular- Procedimientos Básicos. *Manual de Biología Molecular- Procedimientos Básicos*. Pasto, Colombia.
- Burden, R. L., & Douglas Faires, J. (1985). *Numerical Analysis* (Third edition ed.). Prindle, Weber y Schmidt.
- Bustos, A. C., Rubio, V. V., & Navarro, M. C. (2017). Perspectiva histórica del origen evolutivo de la resistencia a antibióticos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *19*(2), 105-117.

Cabral, A. B., Melo, R., Maciel, M. A., & Lopes, A. (2012). Multidrug resistance genes, including blaKPC and blaCTX-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. *a Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 45(5), 572-78.

Cabrera, C., 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. 38(2), 149-158.

Calderón, R., Sacsquispe, R., G Pasterán, F., F Galas, M., Soto, J., Riveros, J., Montoya, Y. (2003). Caracterización molecular de *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido tipo SHV-5 en una unidad de cuidados intensivos neonatal de Lima. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 20(3).

Carattoli, A., Villa, L., Feudi, C., Curcio, L., Orsini, S., Luppi, A., et al. (2017). Novel plasmid-mediated colistin resistance mcr-4 gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Eurosurveillance*, 22(31).

Claudio, R. (2016). Resistencia emergente a los antibióticos: una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 32(1), 1-7.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. (2018.).28th ed. CLSI supplement M100.Wayne, PA: Clínical and Laboratory Standards Institute;

Coculescu, B. I., Palade, A. M., Delcaru, C., Pircalobioru, G., & Berteşteanu, Ş. (2015). Phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella Typhimurium* strains producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) isolated from children (under 4 yearsof age) with diarrhea in romania. *Romanian Biotechnological Letters*, 20(3), 10478.

Colmenares, R., Franco-Soto, J., Leal, C., Moreno, R., Parra, K., Pérez, M., et al. (2015). Susceptibilidad in vitro del *Staphylococcus aureus* al cloranfenicol aislado en muestras de secreciones. *Bol. venez. infectol*, 26(1), 40-45.

Cornejo, A., Serrato, A., Rendón, B., & Rocha, M. G. (2014). Extracción y purificación de ADN. En A. Cornejo, A. Serrato, B. Rendón, & M. G. Rocha, *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (Primera ed., págs. 14-17). México, D.F.: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

Cuadra, J. M. (2017). Filogenia bacteriana mediante el análisis del rRNA 16S. Tlalnepantla, México.

Davis, M. A., Baker, K. N., Orfe, L. H., Shah, D., Besser, T. E., & Call, D. R. (2010). Discovery of a gene conferring multiple-aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(6), 2666-2669.

de la Tabla, V. O., Ortega, A., Buñuel, F., Pérez-Vázquez, M., Marcos, B., & Oteo, J. (2017). Detection of the high-risk clone ST131 of *Escherichia coli* carrying the colistin resistance gene *mcr-1* and causing acute peritonitis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(1), 115-116.

Desimoni, M., Esquivel, G., & Merino, L. (2004). Colonización fecal por cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido en una Unidad Neonatal de Cuidados Intensivos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 22(9), 507-5011.

Dimitriu, T., Misevic, D., Lindner, A. B., & Taddei, F. (2015). Mobile genetic elements are involved in bacterial sociality. *Mobile genetic elements*, 5(1), 7-11.

Dionisio, F., Matic, I., Radman, M., Rodrigues, O., & Taddei, F. (2002). Plasmids spread very fast in heterogeneous bacterial communities. *Genetics*, 162(4), 1525-1532.

Dobiasova, H., & Dolejska, M. (2016). Prevalence and diversity of IncX plasmids carrying fluoroquinolone and β -lactam resistance genes in *Escherichia coli* originating from diverse sources and geographical areas. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(8), 2118-2124.

Farmer, J. J. (1995). *Enterobacteriaceae: Introduction and identification*. En: *Manual of clinical microbiology*, 6, 440. Washington, D.C: ASM Press.

Franco, Y. G., Angarita, M. C., Gutiérrez, M. A., & Trejo-Suárez, J. (2016). Identificación genotípica de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)(*bla*TEM y *bla*SHV) en *Escherichia coli* uropatógena. *Facultad de Ciencias de la Salud*, 3(1), 15.

Frost, L. S., & Koraimann, G. (2010). Regulation of bacterial conjugation: balancing opportunity with adversity. *Future microbiology*, 5(7), 1057-1071.

García-Hernández, A. M., García-Vázquez, E., Hernández-Torres, A., Ruiz, J., Yague, G., Herrero, J. A. (2011). Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas ac. *Rev Esp Quimioter*, 24(2), 57-66.

Gil, Z., Núñez, J., Benevidez, E., & López, E. (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. *Rev. cuerpo méd*, 7(3), 27-30.

Gómez-Aldapa, C. A., Rangel-Vargas, E., Bautista-De León, H., & Castro-Rosas, J. (2014). Presence of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, enterotoxigenic *E. coli*, enteropathogenic *E. coli* and *Salmonella* in fresh beetroot (*Beta vulgaris* L.) juice from public markets in Mexico. *J Sci Food Agric*.

González Mesa, L., Ramos Morí, A., Nadal Becerra, L., Morffi Figueroa, J., Hernández Robledo, E., Alvarez, A. (2007). Identificación fenotípica y molecular de β -lactamasas de espectro extendido TEM y SHV producidas por *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp aislados clínicos de hospitales. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 59(1), 52-58.

González, A., & Nieves, B. (2016). Resistencia a aminoglucósidos y quinolonas en cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas en dos unidades de cuidados intensivos del Hospital Universitario de Los Andes Mérida, Venezuela, entre 2007 y 2009. *Revista Médicas UIS*, 29(2), 21-30.

Grados, M. C., Thuissard, I. J., & Alós, J. I. (2018). Stratification by demographic and clinical data of the antibiotic susceptibility of *Escherichia coli* from urinary tract infections of the community. *Atencion primaria*.

Guzman, M., Salazar, E., Cordero, V., Castro, A., Villanueva, A., Rodulfo, H., y otros. (2019). Multidrug resistance and risk factors associated to community-acquired urinary tract infections caused by *Escherichia coli* in Venezuela. *Biomédica*, 39(Sp 1).

Hadany, L., & Obolski, U. (2012). Implications of stress-induced genetic variation for minimizing multidrug resistance in bacteria. *BMC medicine*, 10(1), 89.

Heredia Coba, A. L. (2018). Aislamiento y caracterización de resistencia a los antibióticos de *Salmonella* en coches de supermercados ubicados en la ciudad de Quito, provincia de Pichincha (Bachelor's thesis). 15-6. Quito: UCE.

Hernández-Gómez, C., Blanco, V. M., Motoa, G., Correa, A., Maya, J. J., de la Cadena, E., Villegas, M V. (2014). Evolución de la resistencia antimicrobiana de bacilos Gram negativos en unidades de cuidados intensivos en Colombia. *Biomédica*, 34(1).

Hernández, J. (2005). *Laboratorio teórico y práctico de Óptica Fisiológica y Psicofísica de la Visión*. Recuperado el 15 de Junio de 2019, de Laboratorio teórico y práctico de Óptica Fisiológica y Psicofísica de la Visión: http://www.ugr.es/~jnieves/web_labdocencia/index_archivos/Apendice%20II%20de%20Teoria%20de%20errores_rev02Feb.pdf

Hernando-Amado, S., Sanz-Garcia, F., Blanco, P., & Martinez, J. L. (2017). Fitness costs associated with the acquisition of antibiotic resistance. *Essays in biochemistry*, 61(1), 37-48.

Hoang, P. H., Awasthi, S. P., Do Nguyen, P., Nguyen, N. L., Nguyen, D. T., Le, N. H., y otros. (2017). Antimicrobial resistance profiles and molecular characterization of *Escherichia coli* strains isolated from healthy adults in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Journal of Veterinary Medical Science*, 79(3), 479-485.

Hospital Departamental de Nariño. (2015). Boletín epidemiológico periodo enero-septiembre 2015. *Boletín epidemiológico periodo enero-septiembre 2015*. Pasto- Nariño, Colombia.

Hospital Departamental de Nariño. (2018). Boletín epidemiológico periodo enero-septiembre 2015. *Boletín epidemiológico periodo enero-septiembre 2018*. Pasto- Nariño, Colombia.

Ho, P. L., Chan, J., Lo, W. U., Lai, E. L., Cheung, Y. Y., & Chow, K. H. (2013). Prevalence and molecular epidemiology of plasmid-mediated fosfomicin resistance genes among blood and urinary *Escherichia coli* isolates. *Journal of medical microbiology*, 62(11), 1707-1713.

Ibañez, D. A., Rojas, A. J., Sánchez, L. E., Fernández, F. E., & Madarriaga, Y. Y. (2018). Patrón sensibilidad/resistencia en los urocultivos de pacientes con ITU que consultan a urgencias de adultos, Hospital de San José entre enero de 2014 y diciembre 2014. *Revista Urología Colombiana/Colombian Urology Journal*.

Ibargüen-Mondragón, E., Mosquera, S., Cerón, M., Burbano-Rosero, E. M., Hidalgo-Bonilla, S. P., Esteva, L., & Romero-Leitón, J. P. (2014). Mathematical modeling on bacterial resistance to multiple antibiotics caused by spontaneous mutations. *Biosystems*, 117, 60-67.

Jamborova, I., Dolejska, M., Zurek, L., Townsend, A. K., Clark, A. B., Ellis, J. C., y otros. (2017). Plasmid-mediated resistance to cephalosporins and quinolones in *Escherichia coli* from American crows in the USA. *Environmental microbiology*, 19(5), 2025-2036.

Jena, J., Debata, N. K., Sahoo, R. K., Gaur, M., & Subudhi, E. (2017). Genetic diversity study of various β -lactamase-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from a tertiary care hospital using ERIC-PCR. *The Indian journal of medical research*, 146(Suppl 1), 23.

Jiménez-Guerra, G., Heras-Cañas, V., Béjar Molina, L., Sorlózano-Puerto, A., Navarro-Marí, J. M., & Gutiérrez-Fernández, J. (2018). *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasa de espectro extendido en infecciones de vías urinarias: evolución de la resistencia antibiótica y opciones terapéuticas. *Medicina Clínica*, 150(7), 262-265.

Johnson, J. R., Johnston, B., Clabots, C., Kuskowski, M. A., & Castanheira, M. (2010). *Escherichia coli* sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant *E. coli* infections in the United States. *Clinical infectious diseases*, 51(3), 286.

Johnson, J. R., Tchesnokova, V., Johnston, B., Clabots, C., Roberts, P. L., Billig, M. (2013). Abrupt emergence of a single dominant multidrug-resistant strain of *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases*, 207(6), 919-928.

Karch, H., Denamur, E., Dobrindt, U., Finlay, B., Hengge, R., Johannes, L. (2012). The enemy within us: lessons from the 2011 European *Escherichia coli* O104:H4 outbreak. *EMBO Mol Med*, 4(9), 841-8.

Krzyzanski, W., & Rao, G. G. (2017). Multi-scale model of drug induced adaptive resistance of Gram-negative bacteria to polymyxin B. *PloS one*, 12(3), e0171834.

Li, Y., Zheng, B., Li, Y., Zhu, S., Xue, F., & Li, J. (2015). Antimicrobial susceptibility and molecular mechanisms of fosfomicin resistance in clinical *Escherichia coli* isolates in mainland China. *PloS one*, 10(8).

Lopatkin, A., Huang, S., Smith, R., Srimani, J., Sysoeva, T., Karig, D., You, Lingchong. (2016). Antibiotics as a selective driver for conjugation dynamics. *Nat Microbiol*, 1(6), 1-22.

López-Ramírez, K. L., Díaz-Maldonado, K. C., Vergara Espinoza, M. A., Santamaría-Veliz, O., Serquén-López, L. M., Canelo Olinda, B., et al. (2018). Patrón de clonalidad mediante ERIC-PCR y REP-PCR de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido, aisladas de pacientes con infección urinaria intrahospitalaria. Hospital Regional Lambayeque, Perú. *Horizonte Médico*, 18(2), 11-18.

Luna-Pineda, V. M., Ochoa, S. A., Cruz-Córdova, A., Cázares-Domínguez, V., Reyes-Grajeda, J. P., Flores-Oropeza, M. A., et al. (2018). Features of urinary *Escherichia coli* isolated from children with complicated and uncomplicated urinary tract infections in Mexico. *PloS one*, 13(10), e0204934.

Lyimo, B., Buza, J., Subbiah, M., Temba, S., Kipasika, H., Smith, W., et al. (2016). IncF plasmids are commonly carried by antibiotic resistant *Escherichia coli* isolated from drinking water sources in northern Tanzania. *International journal of microbiology*, 1-7.

Maguiña, C. (2016). *Uso racional de antibióticos* (Tercera ed.). Colegio Medico del Perú. Lima, Perú.

Mahalingam, N., Manivannan, B., Khamari, B., Siddaramappa, S., Adak, S., & Bulagonda, E. P. (2018). Detection of Antibiotic Resistance Determinants and their

Transmissibility among Clinically-isolated Carbapenem-resistant *Escherichia coli* from South India. *Medical Principles and Practice.*, 428-435.

Marsili, F. (2015). *Tipificación molecular de plásmidos que confieren resistencia a cefotaxima*. XIX Encuentro de Jóvenes Investigadores. Santa fe, Argentina: Universidad Nacional del Litoral.

Martínez, A. M., Flórez, J., Perea, J. R., Rada, B. S. (2014). Quinolonas: sulfamidas: trimetoprima: cotrimoxazol: nitrofurantoína: antisépticos. *In Farmacología humana*, 1027-1043.

Martínez, D., Araque, Y., Rodulfo, H., Caña, L., García, J., Gonzáles, D.(2016). Relación clonal y detección del gen blaKPC en cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos, en un hospital de Venezuela. *Rev Chilena Infectol*, 33(5), 524-530.

Martínez, L. (2006). Mecanismos de adquisición de resistencia a los antibióticos. *Jano*, 2006(1), 26.

Mao, J., & Lu, T. (2016). Population-dynamic modeling of bacterial horizontal gene transfer by natural transformation. *Biophysical journal*, 110(1), 258-268.

McGann, P., Snesrud, E., Maybank, R., Corey, B., Ong, A. C., Clifford, R., Schaecher, K. E. (2016). *Escherichia coli* harboring mcr-1 and blaCTX-M on a novel IncF plasmid: first report of mcr-1 in the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(7), 4420-4421.

Meng, J., Feng, P., & Doyle, M. (2001). Pathogenic *Escherichia coli*. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, in press. *American Public Health Association*.

Michanie, S. (2003). *Escherichia coli* O157: H7 La bacteria que disparó el HACCP en la industria de la carne. *Énfasis Alimentos*, 3(17), 40-42.

Molina, J., Cordero, E., Palomino, J., & Pachón, J. (2009). Aminoglucósidos y polimixinas. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(3), 178-188.

Morejón García, M. (2013). Betalactamasas de espectro extendido. *Revista cubana de medicina*, 52(4), 272-280.

Morejon, M. (2013). *Escherichia coli*, multirresistentes. *Rev Cub Urol*, 2(1), 4-6.

Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J., & Ochoa, T. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 28(4), 648-656.

Murray, J. D. (2003). *Mathematical Biology I: An Introduction*, volume I.

Nazarian, P., Tran, F., & Boedicker, J. Q. (2018). Modeling multispecies gene flow dynamics reveals the unique roles of different horizontal gene transfer mechanisms. *Frontiers in microbiology*, *9*, 2978.

Nguyen, T. T., Guedj, J., Chachaty, E., de Gunzburg, J., Andremont, A., & Mentré, F. (2014). Mathematical modeling of bacterial kinetics to predict the impact of antibiotic colonic exposure and treatment duration on the amount of resistant enterobacteria excreted. *PLoS computational biology*, *10*(9), e1003840.

N'Guyen, Y., & Baumard, S. (2013). Tetraciclinas. Glicilciclinas. *EMC-Tratado de Medicina*, *17*(1), 1-6.

Nicola, F., Nievas, J., & Smayevsky, J. (2012). Evaluación de diversos métodos fenotípicos para la detección de carbapenemasas KPC en *Klebsiella pneumoniae*. *Revista argentina de microbiología*, *44*(4), 290-302.

Nocua-Báez, L. C., Cortés, J. A., Leal, A. L., Arias, G. F., Ovalle-Guerrero, M. V., Saavedra-Rojas, S. Y., y otros. (2017). Perfil de sensibilidad antimicrobiana de microorganismos causantes de infecciones urinarias adquiridas en la comunidad en pacientes con diabetes mellitus en Colombia. *Biomédica*, *37*(3), 453-460.

Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R. I. (1996). Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of bacteriology*, *178*(19), 5636-5643.

Organización Mundial de la Salud. (2014). *Primer reporte sobre la resistencia a antibióticos*.

Organización Mundial de la Salud. (2015). *Plan de acción Mundial Contra la resistencia*. Ginebra.

Organización Mundial de la Salud. (2015). *Proyecto de plan de acción mundial sobre la resistencia*. Ginebra.

Organización Mundial de la Salud (OMS) (2015). *Informe Anual de la Red de Monitoreo: Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos*. Asociación Brasileira de editores científicos .

Organización Mundial de la Salud. (2017). *Escherichia coli*- Nota descriptiva.

Organización Mundial de la Salud (OMS) (Junio de 2018). Plan nacional de respuesta a la resistencia a antimicrobianos. 14-18. Colombia.

Orlek, A., Stoesser, N., Anjum, M. F., Doumith, M., Ellington, M. J., Peto, T. (2017). Plasmid classification in an era of whole-genome sequencing: application in studies of antibiotic resistance epidemiology. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1-24.

Ortega Ortega, M. S. (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 ((Bachelor's thesis, Quito: USFQ).

Ovalle, M. V., Saavedra, S. Y., González, M. N., Hidalgo, A. M., Duarte, C., & Beltrán, M. (2016). Resultados de la vigilancia nacional de resistencia antimicrobiana en infecciones asociadas a la atención en salud en enterobacterias y Gram negativos no fermentadores. *Biomédica*, 37(4), 1-39.

Pardilla, D. (2011). Tesis master: Estudio de protocolos de comunicación bacterianos: conjugación y quorum sensing

Paterson, I. K., Hoyle, A., Ochoa, G., Baker-Austin, C., & Taylor, N. G. (2016). Optimising antibiotic usage to treat bacterial infections. *Scientific reports*, 6, 37853

Patzi-Vargas , S., Zaidi , M. B., Perez-Martinez, I., León-Cen, M., Michel-Ayala, A., Chaussabel, D.(2015). Diarrheogenic *Escherichia coli* carrying supplementary virulence genes are an important cause of moderate to severe diarrhoeal disease in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis*.

Petty, N. K., Zakour, N. L., Stanton-Cook, M., Skippington, E., Totsika, M., Forde , B. M. (2014). Global dissemination of a multidrug resistant *Escherichia coli* clone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(15), 5694-5699.

Porres, N., & Ruiz , E. (2018). *Microbiología clinica* (Vol. 1). Madrid, España: Paraninfo.

Rada , A. M., Hernández-Gómez , C., Restrepo, E., & Villegas , M. (2019). Distribución y caracterización molecular de beta-lactamasas en bacterias Gram negativas en Colombia (2001-2016). *Biomédica*, 39(Sp. 1)

Ramos, E. G. (2016). Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a antimicrobianos en cepas de "*Escherichia coli*" y "*Enterococcus spp.*" de origen alimentario (Doctoral dissertation, Universidad de León).

Redondo, C., & Alonso, G. (2007). Plásmidos conjugativos aislados de cepas multirresistentes de pacientes de cuatro centros de salud del área metropolitana de Caracas.. *Rev Soc Ven Microbio*, 27(2), 100-107.

Revista Panamericana de Salud. (2011). *Numero especial sobre la resistencia bacteriana a los antibióticos.*

Rezai, M. S., Salehifar, E., Rafiei, A., Langae, T., Rafati, M., Shafahi, K. (2015). Characterization of multidrug resistant extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among uropathogens of pediatrics in North of Iran. *BioMed research international*, 2015.

Ríos Capcha, A. W. (2018). Determinación del perfil de resistencia antibiótica de *Salmonella enterica* aislada de cerdos faenados en un matadero de Lima Metropolitana. *Tesis*. Perú.

Rivera, A. (2016). Resistencia a macrólidos en *Mycoplasma pneumoniae* y salud pública. *Acta Médica Grupo Ángeles*, 14(4), 255-257.

Robalino, S., & Wilson, C. (s.f.). Identificación molecular del complejo *Burkholderia cepacia*, bacteria productora de antibióticos, mediante PCR en tiempo real (Bachelor's thesis). 2017.

Rodríguez, E. O. (2018). Perfil de resistencia de *Escherichia coli* en infecciones del tracto urinario (itu), en pacientes de consulta externa de la Fundación Hospital Universitario Metropolitano de Barranquilla. *Revista Edu-Física*, 10(21).

Rojas, J. P., Leal, A. L., Patiño, J., Montañez, A., Camacho, G., Beltrán, S. (2016). Caracterización de pacientes fallecidos por enfermedad neumocócica invasiva en la población infantil de Bogotá, Colombia. *Revista chilena de pediatría*, 48-52.

Romero, J., Ibarguen, E., & Esteva, L. (2018). Modeling mathematically the influence of plasmids on the propagation of bacterial resistance to antibiotics. *Biomath Communications Supplement*, 5(1).

Sachdeva, S., Palur, R. V., Sudhakar, K. U., & Rathinavelan, T. (2017). *E. coli* Group 1 capsular polysaccharide exportation nanomachinery as a plausible antivirulence target in the perspective of emerging antimicrobial resistance. *Frontiers in Microbiology*, 8.

Salgado- Muñoz, T., Morrones-Esquivel, L., Gonzaga-López, T., Matamoros-Mejía, A., Téran-González, J., Arteaga-Vázquez, S., Castro-DFranchis, L; Reyes-Jiménez, A; López-González, D; Meza-Oviedo, D. (2016). Resistencia a quinolonas en enterobacterias con betalactamasa de espectro extendido. *Medicina Interna de México*, 32(3), 277-283.

Sambrook J, Fritschi EF and Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Santos , A. R., Ferrat, G. C., & Eichelmann, M. G. (2005). La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. *Latinoamericana Microbiología*, 47(2005), 92-101

Seija, V., & Vignoli, R. (2006). Principales grupos de antibióticos. En V. Seija, & R. Vignoli, *bacteriología y virología médica*. 631-647.

Singh, A. K., Das, S., Singh, S., Gajamer, V. R., Pradhan, N., Lepcha, Y. D., & Tiwari, H. K. (2018). Prevalence of antibiotic resistance in commensal *Escherichia coli* among the children in rural hill communities of Northeast India. *PloS one*, 13(6), e0199179.

Sosoranga, P. (2018). Eficacia de una prescripción antimicrobiana estructurada en los pacientes con bacteriemia del servicio de onco-hematología del grupo Hospitalario San Vicente, Estrasburgo, Francia. 17-8. Francia.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28(10), 2731-2739.

Ternent, L., Dyson, R. J., Krachler, A. M., & Jabbari, S. (2015). Bacterial fitness shapes the population dynamics of antibiotic-resistant and-susceptible bacteria in a model of combined antibiotic and anti-virulence treatment. *Journal of theoretical biology*, 372, 1-11.

Tomas, X., Cuadros, J., & Gonzáles, L. (2006). *Introducción de calculo numérico* (Vol. 1). Barcelona: Instituc Químic de Sarriá.

Troncoso, C., Pavez, M., Santos, A., Salazar , R., & Barrientos, L. (2017). Implicancias Estructurales y Fisiológicas de la Célula Bacteriana en los Mecanismos de Resistencia Antibiótica. *International Journal of Morphology*, 35(4), 1214-1223.

Vigliarolo, L., Gazzeli, L., Bonofiglio, L., Mollerach, M., & Lopardo, H. (2018). Susceptibility of *Streptococcus pyogenes* isolated from invasive infections to trimethoprim-sulfamethoxazole. *Medicina*, 78(5), 311-314.

Vignoli, R., & Seija, V. (2007). Principales mecanismos de resistencia antibiótica. *Rev Principles and Practice of Infectious Diseases*, 352, 380-391.

Villota, G., & Otero , I. (2009). Características culturales de bacterias cultivables. Grupo de biotecnología microbiana. *Características culturales de bacterias cultivables. Grupo de biotecnología microbiana*. Pasto, Colombia.

Vogwill, T., & MacLean, R. C. (2015). The genetic basis of the fitness costs of antimicrobial resistance: a meta-analysis approach. *Evolutionary applications*, 8(3), 284-295.

Volkova, V. V., Lu, Z., Lanzas, C., & Scott, H. M. (2013). Modelling dynamics of plasmid-gene mediated antimicrobial resistance in enteric bacteria using stochastic differential equations. *Scientific reports*.

Weinstein, R. A., Bonten, M. J., Austin, D. J., & Lipsitch, M. (2001). Understanding the spread of antibiotic resistant pathogens in hospitals: mathematical models as tools for control. *Clinical Infectious Diseases*, 33(10), 1739-1746.

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), 697-703.

Yábar, M. N., Curi-Pesantes, B., Torres, C. A., Calderón-Anyosa, R., Riveros, M., & Ochoa, T. J. (2017). Multirresistencia y factores asociados a la presencia de betalactamasas de espectro extendido en cepas de *Escherichia coli* provenientes de urocultivos. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 34(4), 660-665.

Ye, H., Li, Y., Li, Z., Gao, R., Zhang, H., Wen, R. (2016). Diversified mcr-1 harbouring plasmid reservoirs confer resistance to colistin in human gut microbiota. *MBio*, 7(2), 177-16.

Zambrano-Cobos, A. (2012). Implementación de un ensayo PCR multiplex para la identificación de las enterovariedades de *Escherichia coli* patógenas. *Tesis Doctoral, Escuela Politécnica del Ejército*.

Zill, D. (1997). *Ecuaciones diferenciales con aplicaciones de modelado*. México: International Thomson Editores.

13. Anexos

13.1. Anexo A Fichas de muestras de Orina provenientes del Laboratorio clínico

Código clínico	Código de trabajo	Fecha de aislamiento	Edad Paciente
6021801	1	07/02/2018	
Perfil de resistencia			
Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio
Ampicilina	x		
Ampicilina-sulbactam	x		
Gentamicina	x		
Norfloxacin	x		
Ciprofloxacina	x		
Ertapenem	x		
Ceftazidime	x		
Cefotaxime	x		
Cefotaxina	x		
Cefazolina	x		
Trimetropim- sulfametoxazol	x		
Nitrofurantoina	x		
Aztreonam	x		
Origen:		Orina	

Código clínico	Código de trabajo	Fecha de aislamiento	Edad Paciente
9021801	3	08/02/2018	47
Perfil de resistencia			
Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio
Ampicilina		x	
Ampicilina-sulbactam			x
Gentamicina	x		
Norfloxacin	x		
Ciprofloxacina	x		
Ertapenem	x		
Ceftazidime	x		
Cefotaxime	x		
Cefotaxina	x		
Cefazolina	x		
Trimetropim- sulfametoxazol	x		
Nitrofurantoina	x		
Aztreonam	x		
Origen:		Orina	

Código clínico	Código de trabajo	Fecha de aislamiento	Edad Paciente
10021801	4	09/02/2018	87
Perfil de resistencia			
Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio
Ampicilina		x	
Ampicilina-sulbactam	x		
Gentamicina	x		
Norfloxacin	x		
Ciprofloxacina	x		
Ertapenem	x		
Ceftazidime		x	
Cefotaxime		x	
Cefotaxina			x
Cefazolina		x	
Trimetropim- sulfametoxazol		x	
Nitrofurantoina		x	
Aztreonam		x	
Origen:		Orina	
<hr/>			
Código clínico	Código de trabajo	Fecha de aislamiento	Edad Paciente
16021801	5	16/02/2018	
Perfil de resistencia			
Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio
Ampicilina	x		
Ampicilina-sulbactam	x		
Gentamicina	x		
Norfloxacin	x		
Ciprofloxacina			x
Ertapenem	x		
Ceftazidime	x		
Cefotaxime	x		
Cefotaxina	x		
Cefazolina		x	
Trimetropim- sulfametoxazol	x		
Nitrofurantoina	x		
Origen:		Orina	

Código clínico	Código de trabajo	Fecha de aislamiento	Edad Paciente
17021801	6	17/02/2018	90
Perfil de resistencia			
Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio
Ampicilina		x	
Ampicilina-sulbactam		x	
Gentamicina		x	
Norfloxacin		x	
Ciprofloxacina		x	
Ertapenem	x		
Ceftazidime	x		
Cefotixime	x		
Cefotixina	x		
Cefazolina	x		
Trimetropim- sulfametoxazol	x		
Nitrofurantoina		x	
Aztreonam	x		
Origen:		Orina	

Código clínico	Código de trabajo	Fecha de aislamiento	Edad Paciente
21021801	7	21/02/2018	57
Perfil de resistencia			
Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio
Ampicilina		x	
Ampicilina-sulbactam		x	
Gentamicina		x	
Norfloxacin		x	
Ciprofloxacina		x	
Ertapenem	x		
Ceftazidime		x	
Cefotixime		x	
Cefotixina	x		
Cefazolina		x	
Trimetropim- sulfametoxazol		x	
Nitrofurantoina	x		
Aztreonam		x	
Origen:		Orina	

Código clínico	Código de trabajo	Fecha de aislamiento	Edad Paciente
23021801	8	23/02/2018	55
Perfil de resistencia			
Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio
Ampicilina		x	
Ampicilina-sulbactam	x		
Gentamicina	x		
Norfloxacina	x		
Ciprofloxacina	x		
Ertapenem	x		
Ceftazidime	x		
Cefotoxime	x		
Cefotoxina	x		
Cefazolina	x		
Trimetropim- sulfametoxazol	x		
Nitrofurantoina	x		
Origen:		Orina	

Código clínico	Código de trabajo	Fecha de aislamiento	Edad Paciente
23021802	9	23/02/2018	16
Perfil de resistencia			
Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio
Ampicilina	x		
Ampicilina-sulbactam	x		
Gentamicina	x		
Norfloxacina		x	
Ciprofloxacina		x	
Ertapenem	x		
Ceftazidime	x	x	
Cefotoxime	x	x	
Cefotoxina	x		
Cefazolina	x		
Trimetropim- sulfametoxazol		x	
Nitrofurantoina	x		
Origen:		Orina	

Código clínico	Código de trabajo	Fecha de aislamiento	Edad Paciente
26021801	10	26/02/2018	90
Perfil de resistencia			
Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio
Ampicilina		x	
Ampicilina-sulbactam			x
Gentamicina	x		
Norfloxacin		x	
Ciprofloxacina		x	
Ertapenem	x		
Ceftazidime	x		
Cefotaxime	x		
Cefotaxina	x		
Cefazolina	x		
Trimetropim- sulfametoxazol		x	
Nitrofurantoina	x		
Origen:		Orina	

Código clínico	Código de trabajo	Fecha de aislamiento	Edad Paciente
26021802	11	26/02/2018	52
Perfil de resistencia			
Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio
Ampicilina		x	
Ampicilina-sulbactam			x
Gentamicina	x		
Norfloxacin		x	
Ciprofloxacina		x	
Ertapenem	x		
Ceftazidime	x		
Cefotaxime	x		
Cefotaxina	x		
Cefazolina	x		
Trimetropim- sulfametoxazol		x	
Nitrofurantoina	x		
Origen:		Orina	

Código clínico	Código de trabajo	Fecha de aislamiento	Edad Paciente
26021803	12	26/02/2018	88
Perfil de resistencia			
Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio
Ampicilina		x	
Ampicilina-sulbactam			x
Gentamicina	x		
Norfloxacin		x	
Ciprofloxacina		x	
Ertapenem	x		
Ceftazidime	x		
Cefotixime	x		
Cefotixina	x		
Cefazolina	x		
Trimetropim- sulfametoxazol		x	
Nitrofurantoina	x		
Origen:		Orina	

Código clínico	Código de trabajo	Fecha de aislamiento	Edad Paciente
1031801	13	01/03/2018	
Perfil de resistencia			
Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio
Ampicilina		x	
Ampicilina-sulbactam		x	
Gentamicina	x		
Norfloxacin	x		
Ciprofloxacina	x		
Ertapenem	x		
Ceftazidime	x		
Cefotixime	x		
Cefotixina	x		
Cefazolina	x		
Trimetropim- sulfametoxazol	x		
Nitrofurantoina	x		
Origen:		Orina	

Código clínico	Código de trabajo	Fecha de aislamiento	Edad Paciente
5031801	14	05/03/2018	81
Perfil de resistencia			
Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio
Ampicilina		x	
Ampicilina-sulbactam	x		
Gentamicina		x	
Norfloxacin		x	
Ciprofloxacina		x	
Ertapenem	x		
Ceftazidime	x		
Cefotaxime	x		
Cefotaxina	x		
Cefazolina	x		
Trimetropim- sulfametoxazol		x	
Nitrofurantoina		x	
Origen:		Orina	

Código clínico	Código de trabajo	Fecha de aislamiento	Edad Paciente
6031801	15	06/03/2018	78
Perfil de resistencia			
Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio
Ampicilina		x	
Ampicilina-sulbactam		x	
Gentamicina	x		
Norfloxacin		x	
Ciprofloxacina		x	
Ertapenem	x		
Ceftazidime		x	
Cefotaxime		x	
Cefotaxina		x	
Cefazolina		x	
Trimetropim- sulfametoxazol		x	
Nitrofurantoina	x		
Aztreonam		x	
Origen:		Orina	

Código clínico	Código de trabajo	Fecha de aislamiento	Edad Paciente
6031802	16	06/03/2018	69
Perfil de resistencia			
Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio
Ampicilina	x		
Ampicilina-sulbactam	x		
Gentamicina	x		
Norfloxacin		x	
Ciprofloxacina		x	
Ertapenem	x		
Ceftazidime	x		
Cefotixime	x		
Cefotixina	x		
Cefazolina	x		
Trimetropim- sulfametoxazol	x		
Nitrofurantoina	x		
Origen:		Orina	

Código clínico	Código de trabajo	Fecha de aislamiento	Edad Paciente
8031802	17	08/03/2018	32
Perfil de resistencia			
Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio
Ampicilina		x	
Ampicilina-sulbactam	x		
Gentamicina	x		
Norfloxacin	x		
Ciprofloxacina	x		
Ertapenem	x		
Ceftazidime	x		
Cefotixime	x		
Cefotixina	x		
Cefazolina	x		
Trimetropim- sulfametoxazol	x		
Nitrofurantoina	x		
Origen:		Orina	

Código clínico	Código de trabajo	Fecha de aislamiento	Edad Paciente
8031802	18	08/03/2018	32
Perfil de resistencia			
Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio
Ampicilina		x	
Ampicilina-sulbactam	x		
Gentamicina	x		
Norfloxacin	x		
Ciprofloxacina	x		
Ertapenem	x		
Ceftazidime	x		
Cefotaxime	x		
Cefotaxina	x		
Cefazolina	x		
Trimetropim- sulfametoxazol	x		
Nitrofurantoina	x		
Origen:		Orina	

Código clínico	Código de trabajo	Fecha de aislamiento	Edad Paciente
9031801	19	09/03/2018	78
Perfil de resistencia			
Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio
Ampicilina		x	
Ampicilina-sulbactam			x
Gentamicina	x		
Norfloxacin		x	
Ciprofloxacina		x	
Ertapenem	x		
Ceftazidime	x		
Cefotaxime	x		
Cefotaxina	x		
Cefazolina	x		
Trimetropim- sulfametoxazol	x		
Nitrofurantoina			x
Origen:		Orina	

Código clínico	Código de trabajo	Fecha de aislamiento	Edad Paciente
26031802	20	26/03/2018	
Perfil de resistencia			
Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio
Ampicilina		x	
Ampicilina-sulbactam	x		
Gentamicina		x	
Norfloxacin		x	
Ciprofloxacina		x	
Ertapenem	x		
Ceftazidime	x		
Cefotixime	x		
Cefotixina	x		
Cefazolina		x	
Trimetropim- sulfametoxazol	x		
Nitrofurantoina	x		
Origen:		Orina	

Código clínico	Código de trabajo	Fecha de aislamiento	Edad Paciente
2041801	21	02/04/2018	
Perfil de resistencia			
Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio
Ampicilina		x	
Ampicilina-sulbactam	x		
Gentamicina	x		
Norfloxacin		x	
Ciprofloxacina		x	
Ertapenem	x		
Ceftazidime	x		
Cefotixime	x		
Cefotixina	x		
Cefazolina	x		
Trimetropim- sulfametoxazol		x	
Nitrofurantoina	x		
Origen:		Orina	

Código clínico	Código de trabajo	Fecha de aislamiento	Edad Paciente
4041801	22	04/04/2018	
Perfil de resistencia			
Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio
Ampicilina		x	
Ampicilina-sulbactam		x	
Gentamicina	x		
Norfloxacin	x		
Ciprofloxacina	x		
Ertapenem	x		
Ceftazidime	x		
Cefotaxime	x		
Cefotaxina	x		
Cefazolina	x		
Trimetropim- sulfametoxazol	x		
Nitrofurantoina	x		
Origen:		Orina	

Código clínico	Código de trabajo	Fecha de aislamiento	Edad Paciente
4041802	23	04/04/2018	
Perfil de resistencia			
Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio
Ampicilina		x	
Ampicilina-sulbactam	x		
Gentamicina	x		
Norfloxacin	x		
Ciprofloxacina	x		
Ertapenem	x		
Ceftazidime	x		
Cefotaxime	x		
Cefotaxina	x		
Cefazolina	x		
Trimetropim- sulfametoxazol		x	
Nitrofurantoina	x		
Origen:		Orina	

Código clínico	Código de trabajo	Fecha de aislamiento	Edad Paciente
9041801	24	09/04/2018	68
Perfil de resistencia			
Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio
Ampicilina	x		
Ampicilina-sulbactam			x
Gentamicina	x		
Norfloxacin		x	
Ciprofloxacina		x	
Ertapenem	x		
Ceftazidime	x		
Cefotaxime	x		
Cefotaxina	x		
Cefazolina	x		
Trimetropim- sulfametoxazol		x	
Nitrofurantoina	x		
Origen:		Orina	

Código clínico	Código de trabajo	Fecha de aislamiento	Edad Paciente
9041802	25	09/04/2018	49
Perfil de resistencia			
Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio
Ampicilina	x		
Ampicilina-sulbactam	x		
Gentamicina	x		
Norfloxacin	x		
Ciprofloxacina	x		
Ertapenem	x		
Ceftazidime	x		
Cefotaxime	x		
Cefotaxina	x		
Cefazolina	x		
Trimetropim- sulfametoxazol	x		
Nitrofurantoina		x	
Aztreonam	x		
Origen:		Orina	

Código clínico	Código de trabajo	Fecha de aislamiento	Edad Paciente
18041801	26	16/04/2018	78
Perfil de resistencia			
Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio
Ampicilina		x	
Ampicilina-sulbactam			x
Gentamicina	x		
Norfloxacin		x	
Ciprofloxacina		x	
Ertapenem	x		
Ceftazidime	x		
Cefotaxime	x		
Cefotaxina	x		
Cefazolina			
Trimetropim- sulfametoxazol		x	
Nitrofurantoina			x
Origen:		Orina	

Código clínico	Código de trabajo	Fecha de aislamiento	Edad Paciente
18041802	27	16/04/2018	68
Perfil de resistencia			
Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio
Ampicilina		x	
Ampicilina-sulbactam	x		
Gentamicina	x		
Norfloxacin		x	
Ciprofloxacina		x	
Ertapenem	x		
Ceftazidime		x	
Cefotaxime		x	
Cefotaxina	x		
Cefazolina		x	
Trimetropim- sulfametoxazol		x	
Nitrofurantoina		x	
Origen:		Orina	

Código clínico	Código de trabajo	Fecha de aislamiento	Edad Paciente
20041801	28	20/04/2018	
Perfil de resistencia			
Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio
Ampicilina		x	
Ampicilina-sulbactam		x	
Gentamicina		x	
Norfloxacin		x	
Ciprofloxacina		x	
Ertapenem	x		
Ceftazidime		x	
Cefotixime		x	
Cefotixina		x	
Cefazolina	x		
Nitrofurantoina			x
Aztreonam		x	
Origen:		Orina	

Código clínico	Código de trabajo	Fecha de aislamiento	Edad Paciente
9041802	29	16/04/2018	6
Perfil de resistencia			
Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio
Ampicilina		x	
Ampicilina-sulbactam		x	
Gentamicina		x	
Norfloxacin	x		
Ciprofloxacina	x		
Ertapenem	x		
Ceftazidime	x		
Cefotixime	x		
Cefotixina	x		
Trimetropim- sulfametoxazol		x	
Nitrofurantoina	x		
Origen:		Orina	

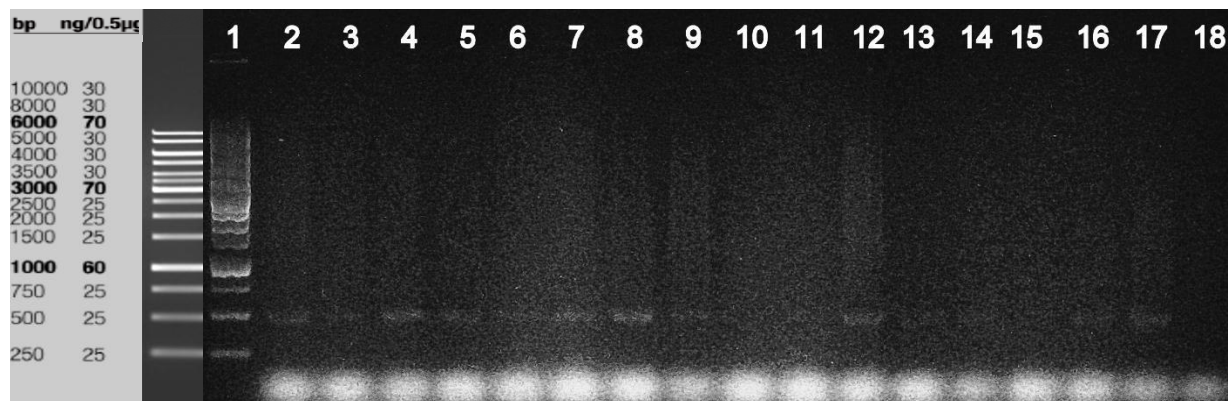
Código clínico	Código de trabajo	Fecha de aislamiento	Edad Paciente
9051801	30	09/05/2018	90
Perfil de resistencia			
Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio
Ampicilina		x	
Ampicilina-sulbactam		x	
Gentamicina	x		
Norfloxacin		x	
Ciprofloxacina		x	
Ertapenem	x		
Ceftazidime	x		
Cefotixime	x		
Trimetropim- sulfametoxazol	x		
Nitrofurantoina	x		
Aztreonam		x	
Origen:			Orina

Código clínico	Código de trabajo	Fecha de aislamiento	Edad Paciente
9051802	31	09/05/2018	72
Perfil de resistencia			
Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio
Ampicilina		x	
Ampicilina-sulbactam		x	
Gentamicina	x		
Norfloxacin		x	
Ciprofloxacina		x	
Ertapenem	x		
Ceftazidime		x	
Cefotixime		x	
Cefotixina	x		
Trimetropim- sulfametoxazol		x	
Nitrofurantoina	x		
Aztreonam		x	
Origen:			Orina

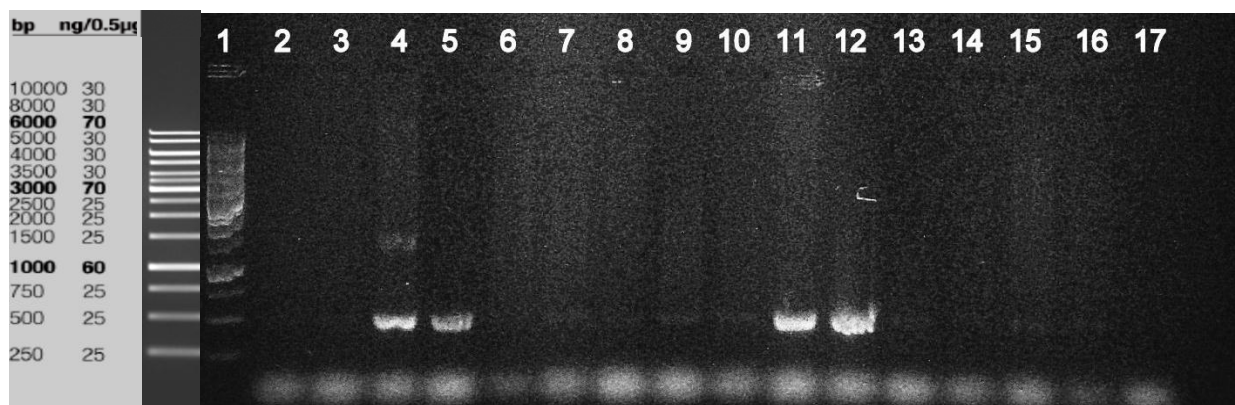
Código clínico	Código de trabajo	Fecha de aislamiento	Edad Paciente
9051803	32	09/05/2018	
Perfil de resistencia			
Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio
Ampicilina		x	
Ampicilina-sulbactam		x	
Gentamicina	x		
Norfloxacin	x		
Ciprofloxacina	x		
Ertapenem	x		
Ceftazidime	x		
Cefotaxime	x		
Cefotaxina	x		
Trimetropim- sulfametoxazol		x	
Nitrofurantoina		x	
Origen:			Orina

Código clínico	Código de trabajo	Fecha de aislamiento	Edad Paciente
9051804	33	09/05/2018	
Perfil de resistencia			
Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio
Ampicilina		x	
Ampicilina-sulbactam	x		
Gentamicina		x	
Norfloxacin		x	
Ciprofloxacina		x	
Ertapenem	x		
Ceftazidime	x		
Cefotaxime	x		
Cefotaxina	x		
Trimetropim- sulfametoxazol		x	
Nitrofurantoina	x		
Origen:			Orina

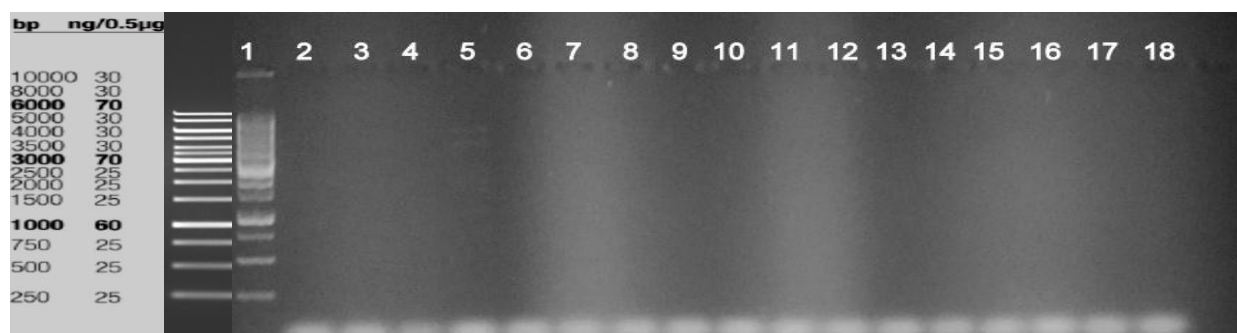
13.2. Anexo B. Amplificación genes de resistencia en DNA cromosomal y plasmídico.



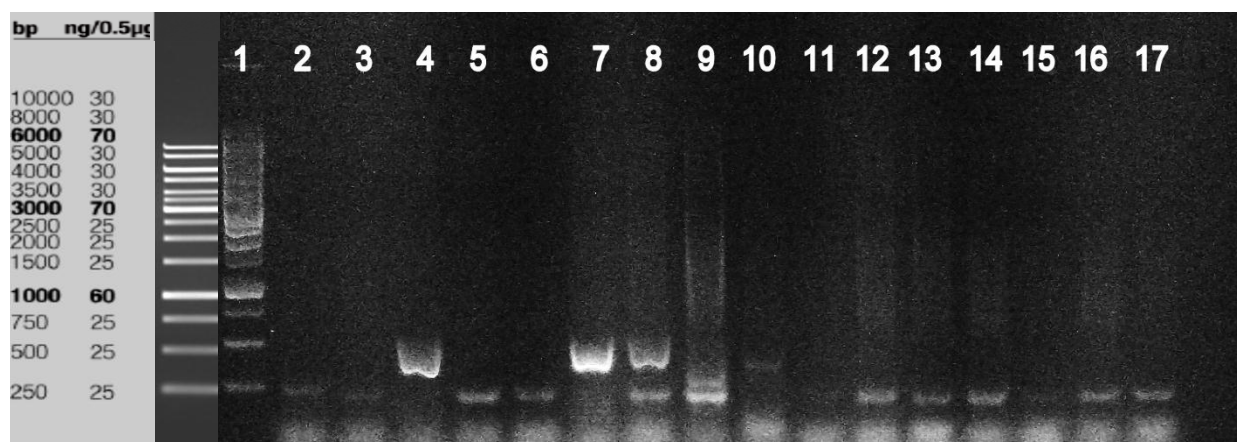
Amplificados gen de resistencia *KPCF* a partir de DNA cromosomal de los aislados de *E. coli*. Gel agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Intercalante usado Gel Red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el carril 1 se observa el marcador molecular *1Kb*. (Promega), en los carriles del 2 al 18, aislados 1,3, 4, 5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17 y 18 de *E. coli* respectivamente.



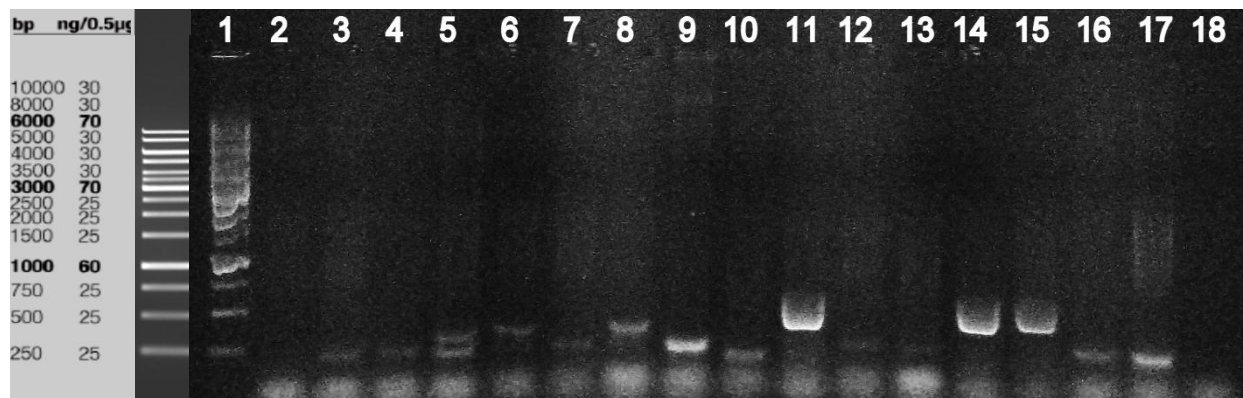
Amplificados gen de resistencia *KPCF* a partir de DNA cromosomal de los aislados de *E. coli*. Gel agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Intercalante usado Gel Red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el carril 1 se observa el marcador molecular *1Kb*. (Promega), en los carriles del 2 al 16, aislados 19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32 y 33 de *E. coli* respectivamente, carril 17 control negativo.



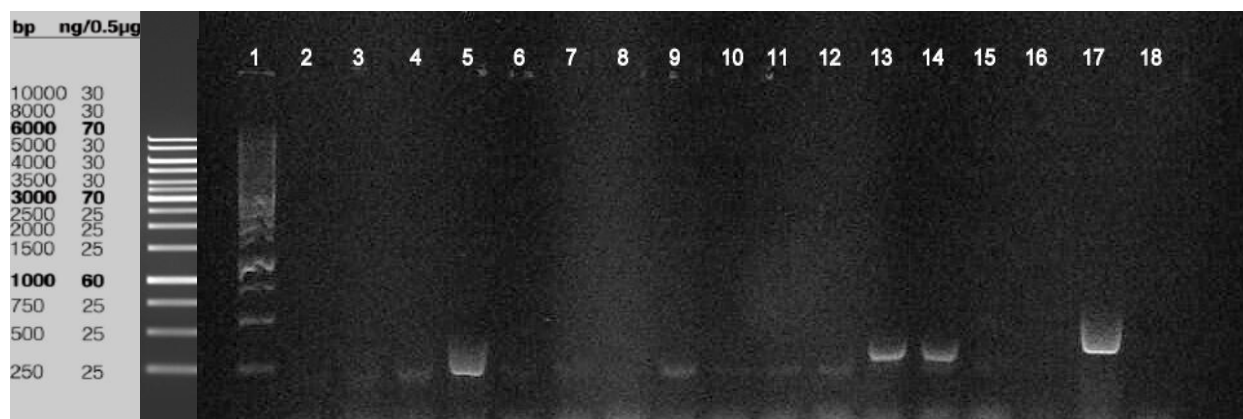
Amplificados gen de resistencia *KPCF* a partir de DNA plasmídico de los aislados de *E. coli*. Gel agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Intercalante usado Gel Red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el carril 1 se observa el marcador molecular *1Kb*. (Promega), en los carriles del 2 al 17, aislados 3, 5, 6, 9, 11, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 26, 28, y 31 de *E. coli* respectivamente y carril 18 control negativo.



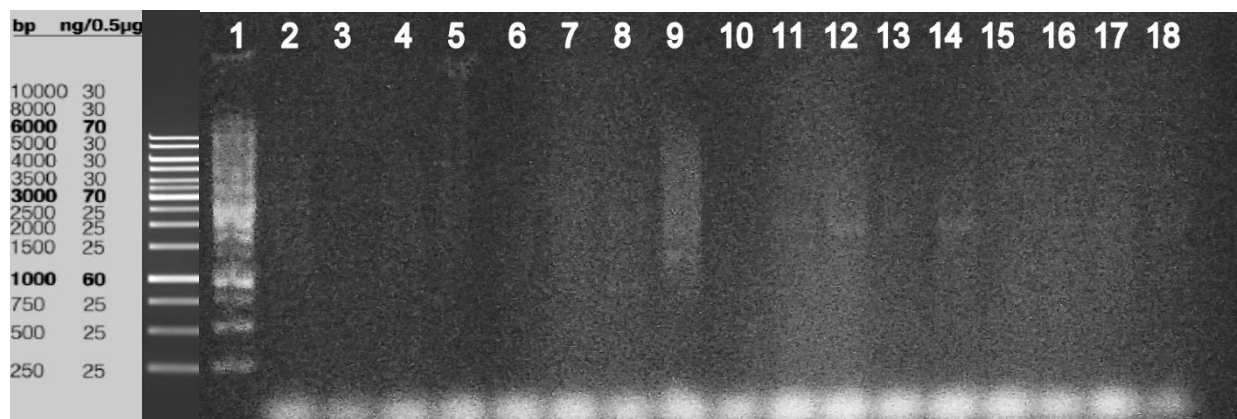
Amplificados gen de resistencia *CTXMI* a partir de DNA cromosomal de los aislados de *E. coli*. Gel agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Intercalante usado Gel Red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el carril 1 se observa el marcador molecular *1Kb*. (Promega), en los carriles del 2 al 18, aislados 1,3,4, 5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16 y 17 de *E. coli* respectivamente.



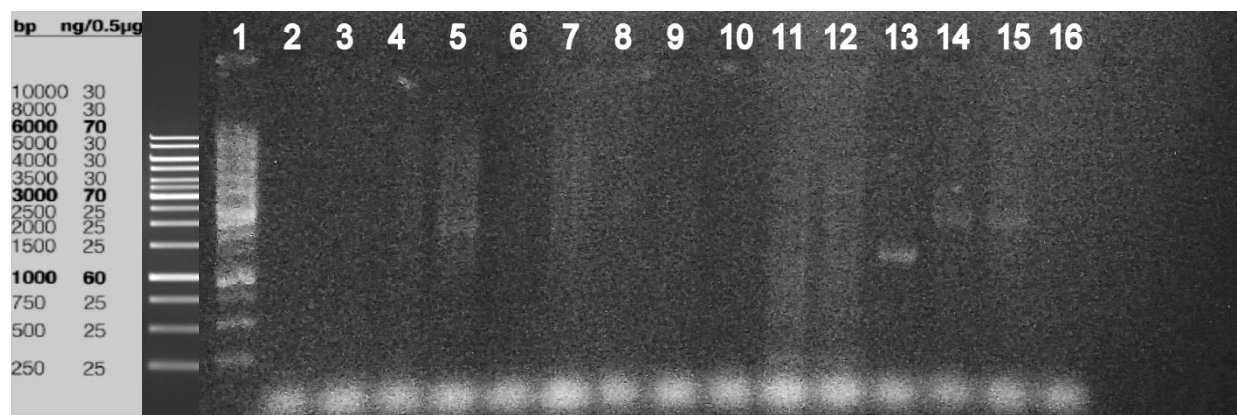
Amplificados gen de resistencia *CTXMI* a partir de DNA cromosomal de los aislados de *E. coli*. Gel agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Intercalante usado Gel Red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el carril 1 se observa el marcador molecular *1Kb.* (Promega), en los carriles del 2 al 17, aislados 18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32 y 33 de *E. coli* respectivamente y carril 18 control negativo.



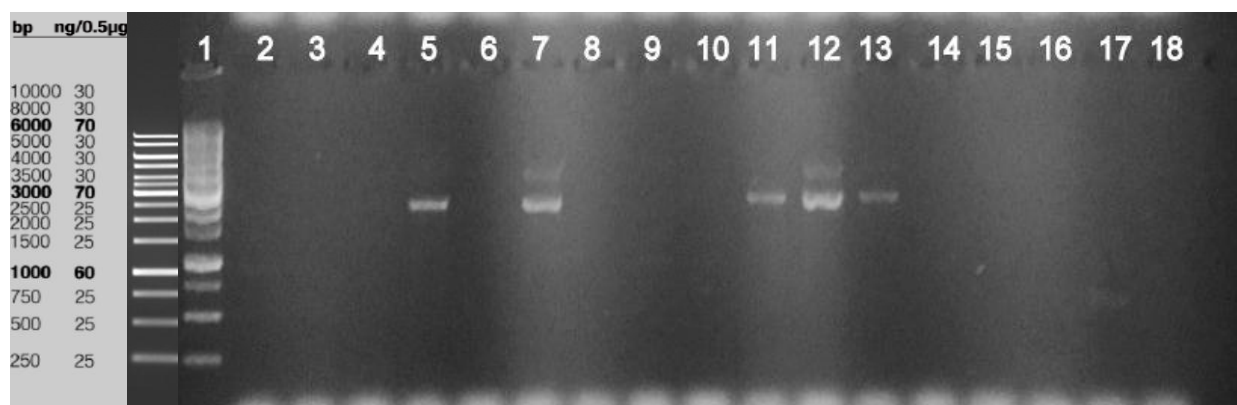
Amplificados gen de resistencia *CTXMI* a partir de DNA plasmídico de los aislados de *E. coli*. Gel agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Intercalante usado Gel Red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el carril 1 se observa el marcador molecular *1Kb.* (Promega), en los carriles del 2 al 17, aislados 3, 5, 6, 9, 11, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 26, 28, y 31 de *E. coli* respectivamente y carril 18 control negativo.



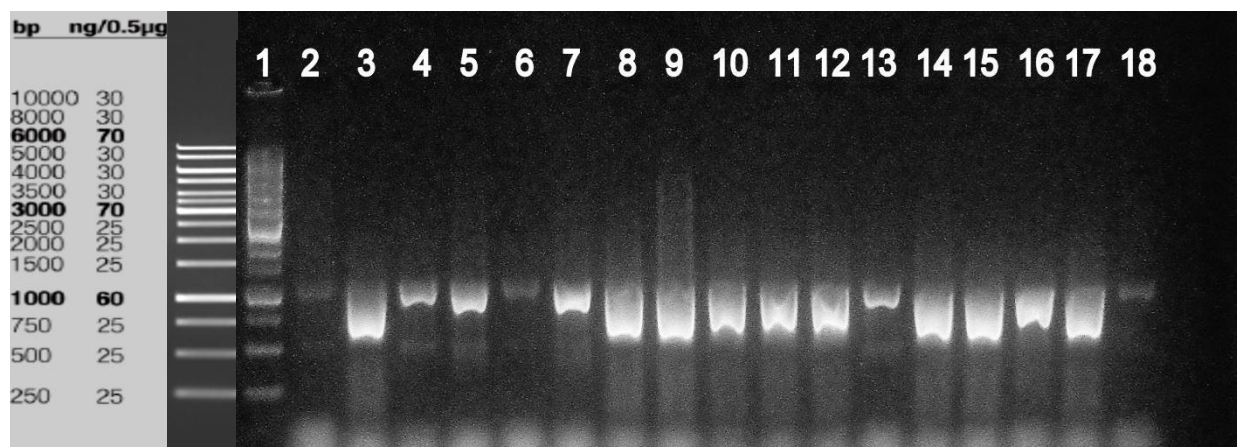
Amplificados gen de resistencia *CTXM2* a partir de DNA cromosomal de los aislados de *E. coli*. Gel agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Intercalante usado Gel Red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el carril 1 se observa el marcador molecular *1Kb.* (Promega), en los carriles del 2 al 18, aislados 1,3,4, 5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17 y 18 de *E. coli* respectivamente.



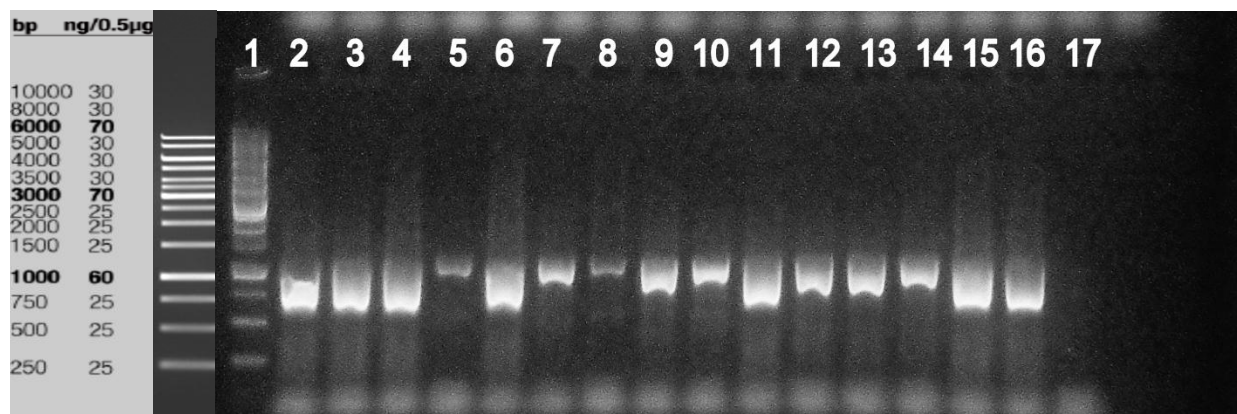
Amplificados gen de resistencia *CTXM2* a partir de DNA cromosomal de los aislados de *E. coli*. Gel agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Intercalante usado Gel Red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el carril 1 se observa el marcador molecular *1Kb.* (Promega), en los carriles del 2 al 16, aislados 19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32 y 33 de *E. coli* respectivamente y carril 17 control negativo.



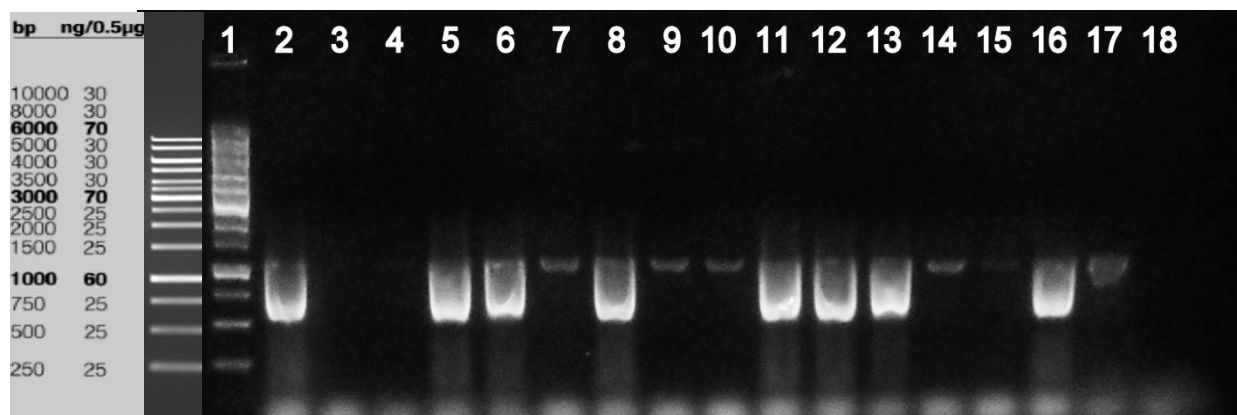
Amplificados gen de resistencia *CTXM2* a partir de DNA plasmídico de los aislados de *E. coli*. Gel agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Intercalante usado Gel Red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el carril 1 se observa el marcador molecular *1Kb.* (Promega), en los carriles del 2 al 17, aislados 3, 5, 6, 9, 11, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 26, 28, y 31 de *E. coli* respectivamente y carril 18 control negativo.



Amplificados gen de resistencia *TEM* a partir de DNA cromosomal de los aislados de *E. coli*. Gel agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Intercalante usado Gel Red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el carril 1 se observa el marcador molecular *1Kb.* (Promega), en los carriles del 2 al 18, aislados 31, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18 de *E. coli* respectivamente.

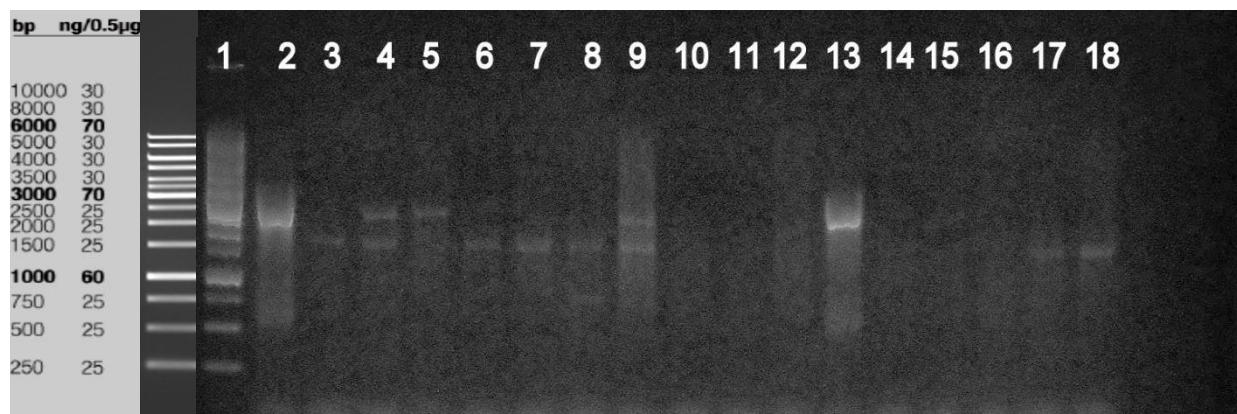


Amplificados gen de resistencia *TEM* a partir de DNA cromosomal de los aislados de *E. coli*. Gel agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Intercalante usado Gel Red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el carril 1 se observa el marcador molecular 1Kb. (Promega), en los carriles del 2 al 16, aislados 19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32 y 33 de *E. coli* respectivamente y carril 17 control negativo.



Amplificados gen de resistencia *TEM* a partir de DNA plasmídico de los aislados de *E. coli*. Gel agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Intercalante usado Gel Red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el carril 1 se observa el marcador

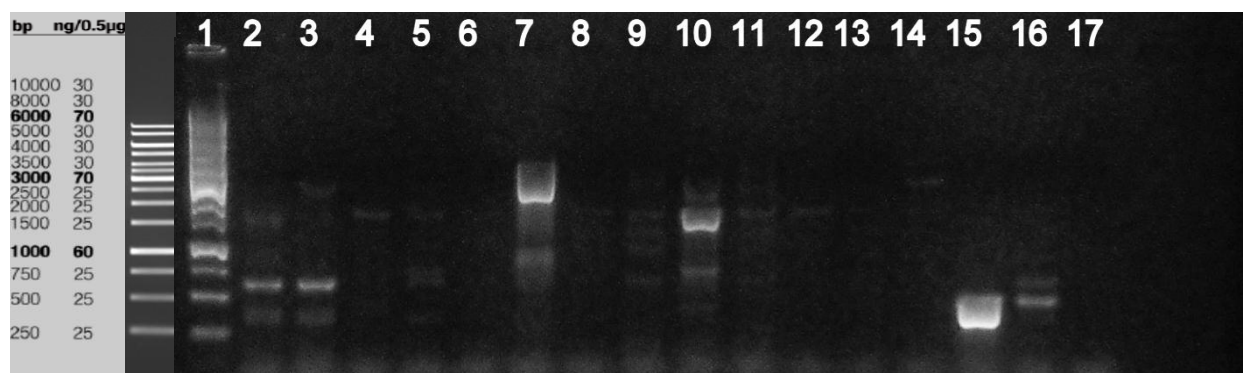
molecular *IKb*. (Promega), en los carriles del 2 al 17, aislados 3, 5, 6, 9, 11, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 26, 28, y 31 de *E. coli* respectivamente y carril 18 control negativo.



Amplificados gen de resistencia *SHVI* a partir de DNA cromosomal de los aislados de *E. coli*. Gel agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Intercalante usado Gel Red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el carril 1 se observa el marcador molecular *IKb*. (Promega), en los carriles del 2 al 18, aislados 1,3, 4, 5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17 y 18 de *E. coli* respectivamente.



Amplificados gen de resistencia *SHVI* a partir de DNA cromosomal de los aislados de *E. coli*. Gel agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Intercalante usado Gel Red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el carril 1 se observa el marcador molecular *IKb*. (Promega), en los carriles del 2 al 16, 19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32 y 33 de *E. coli* respectivamente y carril 17 control negativo.



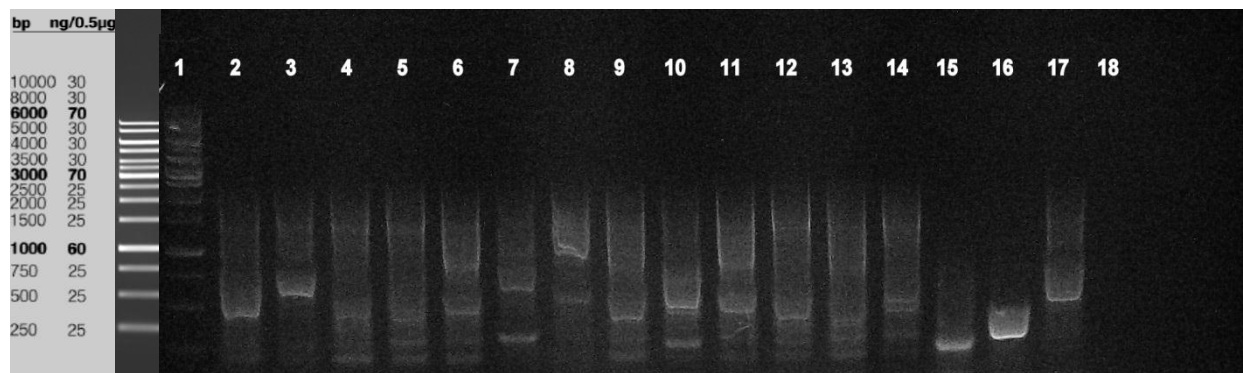
Amplificados gen de resistencia *SHVI* a partir de DNA plasmídico de los aislados de *E. coli*. Gel agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Intercalante usado Gel Red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el carril 1 se observa el marcador molecular *1Kb.* (Promega), en los carriles del 2 al 17, aislados 3, 5, 6, 9, 11, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 26, 28, y 31 de *E. coli* respectivamente y carril 18 control negativo.



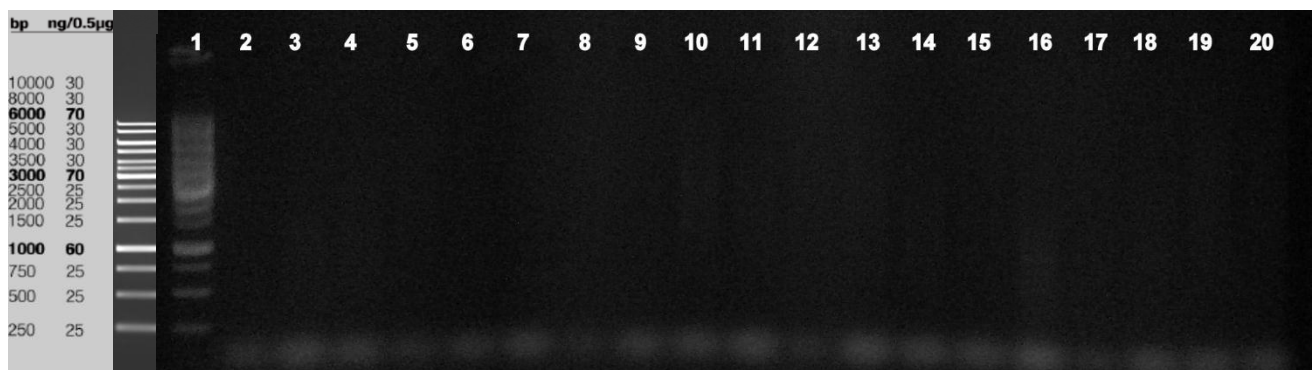
Amplificados gen de resistencia *SHV3* a partir de DNA cromosomal de los aislados de *E. coli*. Gel agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Intercalante usado Gel Red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el carril 1 se observa el marcador molecular *1Kb.* (Promega), en los carriles del 2 al 18, aislados 1,3, 4, 5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17 y 18 de *E. coli* respectivamente.



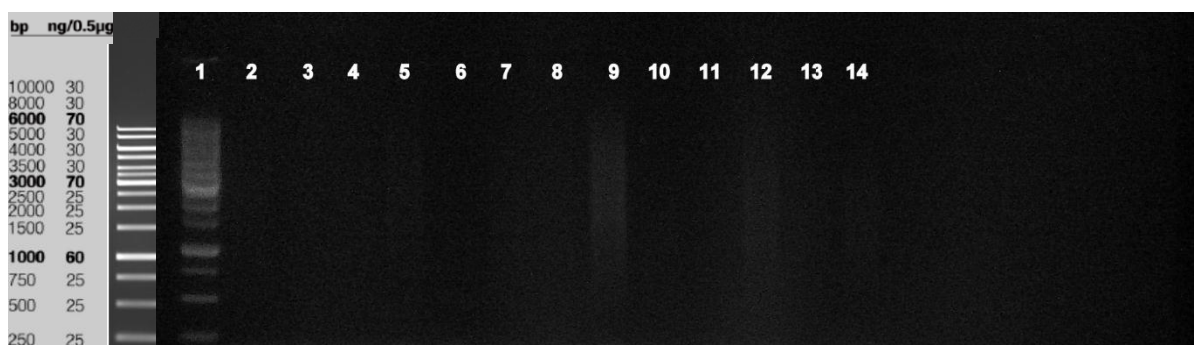
Amplificados gen de resistencia *SHV3* a partir de DNA cromosomal de los aislados de *E. coli*. Gel agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Intercalante usado Gel Red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el carril 1 se observa el marcador molecular *1Kb*. (Promega), en los carriles del 2 al 16, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 y 33 de *E. coli* respectivamente y carril 17 control negativo.



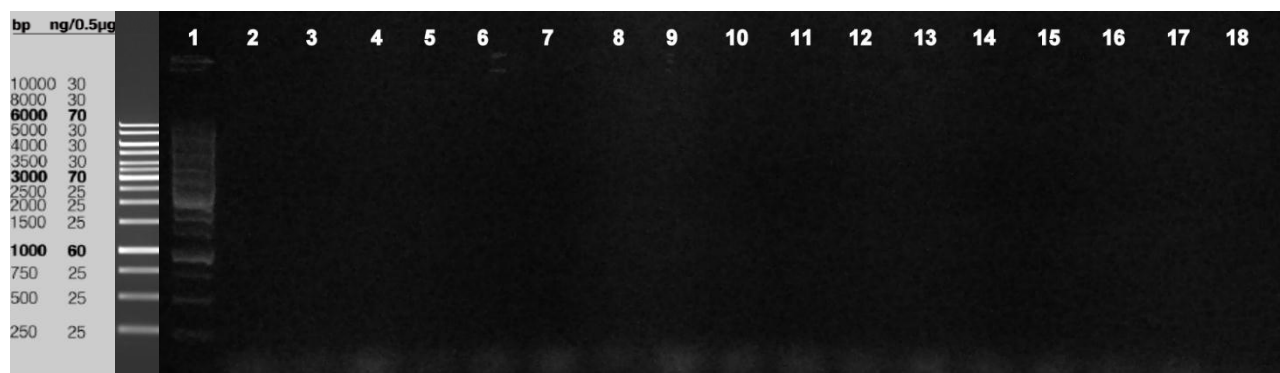
Amplificados gen de resistencia *SHV3* a partir de DNA plasmídico de los aislados de *E. coli*. Gel agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Intercalante usado Gel Red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el carril 1 se observa el marcador molecular *1Kb*. (Promega), en los carriles del 2 al 17, aislados 3, 5, 6, 9, 11, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 26, 28, y 31 de *E. coli* respectivamente y carril 18 control negativo.



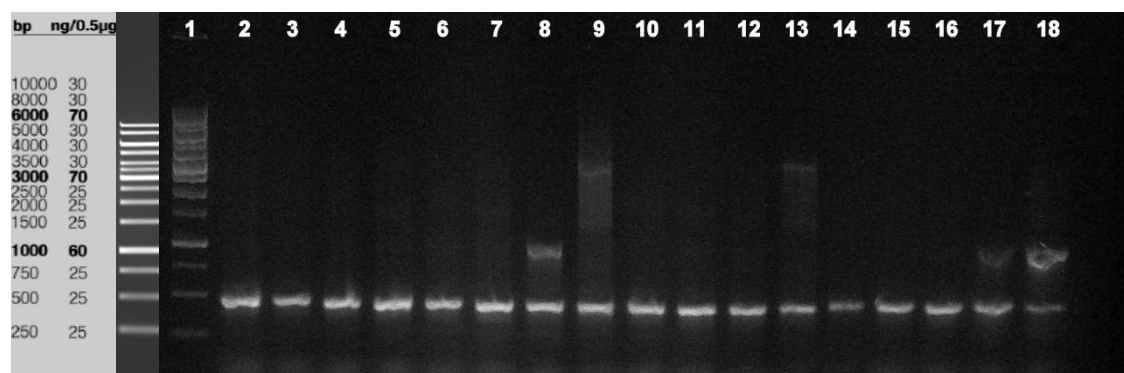
Amplificados gen de resistencia *KPCR* a partir de DNA cromosomal de los aislados de *E. coli*. Gel agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Intercalante usado Gel Red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el carril 1 se observa el marcador molecular *1Kb*. (Promega), en los carriles del 2 al 20, aislados 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 20 de *E. coli* respectivamente.



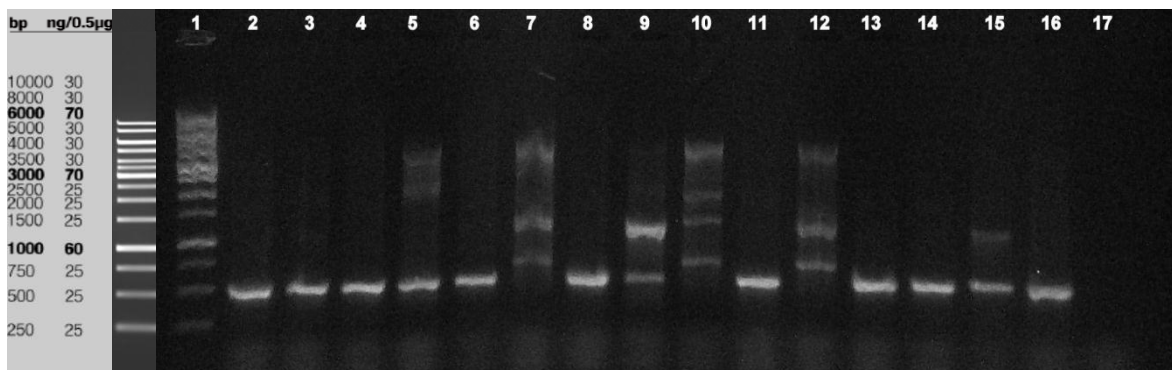
Amplificados gen de resistencia *KPCR* a partir de DNA cromosomal de los aislados de *E. coli*. Gel agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Intercalante usado Gel Red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el carril 1 se observa el marcador molecular *1Kb*. (Promega), en los carriles del 2 al 14, aislados 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 de *E. coli* respectivamente y carril 15 control negativo.



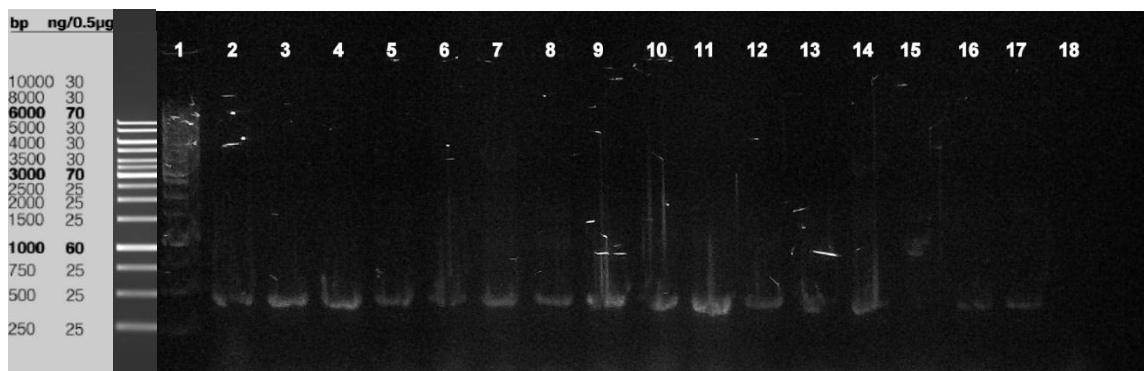
Amplificados gen de resistencia *KPCR* a partir de DNA plasmídico de los aislados de *E. coli*. Gel agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Intercalante usado Gel Red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el carril 1 se observa el marcador molecular *1Kb*. (Promega), en los carriles del 2 al 17, aislados 3, 5, 6, 9, 11, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 26, 28, y 31 de *E. coli* respectivamente y carril 18 control negativo.



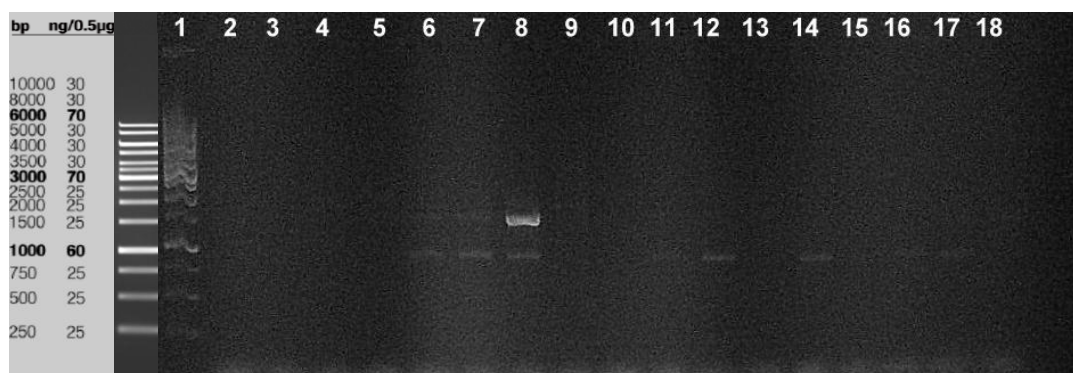
Amplificados gen de resistencia *Mcr-I* a partir de DNA cromosomal de los aislados de *E. coli*. Gel agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Intercalante usado Gel Red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el carril 1 se observa el marcador molecular *1Kb*. (Promega), en los carriles del 2 al 18, aislados 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 y 17 de *E. coli* respectivamente.



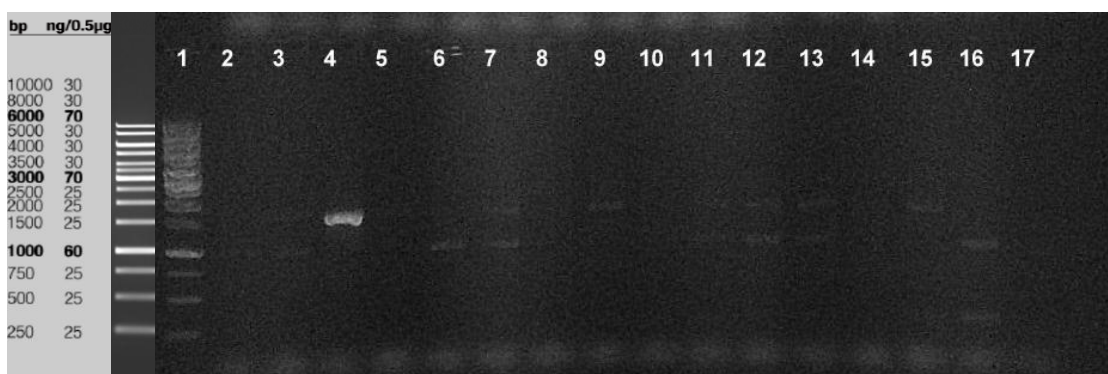
Amplificados gen de resistencia *Mcr-I* a partir de DNA cromosomal de los aislados de *E. coli*. Gel agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Intercalante usado Gel Red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el carril 1 se observa el marcador molecular *IKb*. (Promega), en los carriles del 2 al 16, aislados 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 y 33 de *E. coli* respectivamente y carril 17 control negativo.



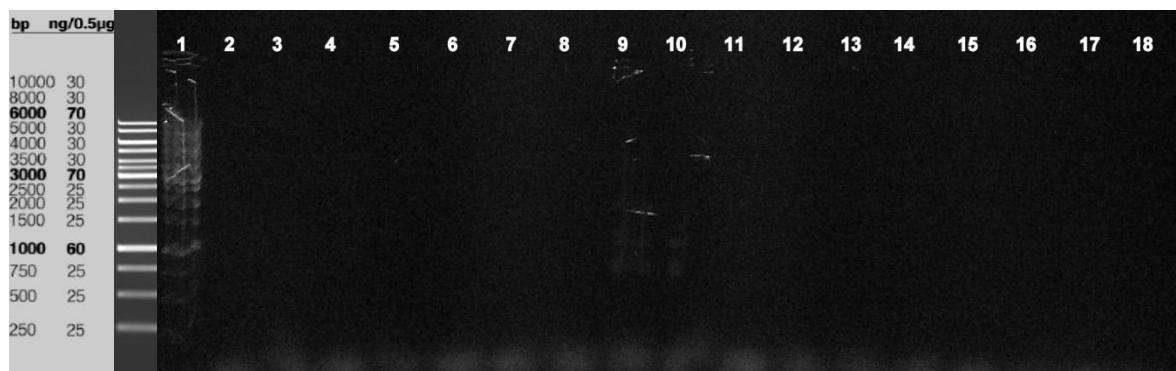
Amplificados gen de resistencia *Mcr-I* a partir de DNA plasmídico de los aislados de *E. coli*. Gel agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Intercalante usado Gel Red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el carril 1 se observa el marcador molecular *IKb*. (Promega), en los carriles del 2 al 17, aislados 3, 5, 6, 9, 11, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 26, 28, y 31 de *E. coli* respectivamente y carril 18 control negativo.



Amplificados gen de resistencia *FosA* a partir de DNA cromosomal de los aislados de *E. coli*. Gel agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Intercalante usado Gel Red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el carril 1 se observa el marcador molecular *1Kb*. (Promega), en los carriles del 2 al 18, aislados 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 y 17 de *E. coli* respectivamente.



Amplificados gen de resistencia *FosA* a partir de DNA cromosomal de los aislados de *E. coli*. Gel agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Intercalante usado Gel Red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el carril 1 se observa el marcador molecular *1Kb*. (Promega), en los carriles del 2 al 16, aislados 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 y 33 de *E. coli* respectivamente y carril 17 control negativo.



Amplificados gen de resistencia *FosA* a partir de DNA plasmídico de los aislados de *E. coli*. Gel agarosa 1%, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Intercalante usado Gel Red (Biotium) y fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el carril 1 se observa el marcador molecular *1Kb*. (Promega), en los carriles del 2 al 17, aislados 3, 5, 6, 9, 11, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 26, 28, y 31 de *E. coli* respectivamente y carril 18 control negativo.

Acta de Aprobación No. 002

EI COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE NARIÑO.

Creado por el Sistema de Investigaciones mediante Resolución Rectoral N° 1608 de Abril 20 del 2010, el cual se rige por la Resolución N° 008430 del 4 de Octubre 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, mediante la cual se establece las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud.

Que en relación al proyecto de investigación **“DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE LA BACTERIA *ESCHERICHIA COLI* VINCULADA CON INFECCIONES URINARIAS EN LA CIUDAD DE SAN JUAN DE PASTO (NARIÑO)”** Certifica que:

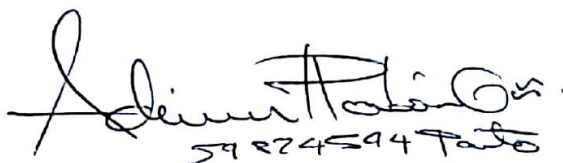
1. Los integrantes del proyecto de investigación en mención adjuntaron los siguientes documentos:
 - Proyecto de investigación.
 - Aval Institucional.
2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité.
3. Según las categorías establecidas en el artículo 11 de la resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, el presente estudio tiene el siguiente riesgo

Sin riesgo. Riesgo mínimo Riesgo mayor del mínimo
4. El Comité informará de manera inmediata a las directivas institucionales toda novedad que reciba acerca de:
 - a. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisada y aprobada por el Comité.
5. El presente proyecto ha sido aprobado por el periodo correspondiente al cronograma propuesto por los investigadores.
6. El investigador principal deberá informar al Comité de Ética en Investigaciones de la Universidad de Nariño a saber:
 - a. Cualquier cambio que se proponga introducir en este proyecto. Estos cambios no podrán iniciarse sin la revisión y aprobación del Comité, excepto cuando sean necesarios para eliminar peligros inminentes para los sujetos.
 - b. Cualquier problema imprevisto que involucre riesgo para los sujetos u otros.
 - c. Cualquier evento adverso serio en las primeras 24 horas de ocurrido.
 - d. Cualquier conocimiento nuevo respecto al estudio, que pueda afectar la tasa riesgo/beneficio para los sujetos participantes.
 - e. Cualquier decisión tomada por otros Comités de Ética.
 - f. La terminación prematura o suspensión del proyecto explicando la razón para esto.
 - g. El investigador principal de la Universidad de Nariño deberá presentar un informe semestral al Comité de Ética en Investigación.

Por medio de la presente, el Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Nariño, avala el proyecto arriba mencionado en el marco de los principios, políticas y procedimientos del Manual de normas y procedimientos de bioseguridad para laboratorios de la Universidad de Nariño, la declaración de Helsinki, de la Asamblea Médica Mundial, de la ley 44 de 1993 de la República de Colombia y de la reglamentación vigente del Comité de Ética de la Universidad de Nariño.

Dado en Pasto al día quince (15) del mes de mayo del dos mil dieciocho (2018)

Delegado



59 224594 Pasto

Proyectó: *Madelyn Matabanchoy*



CERTIFICACIÓN No. RCL-19-6398

TECNOLOGÍAS AMBIENTALES DE COLOMBIA S.A.S. E.S.P. – TECNIAMSA

NIT: 805.001.538-5

CERTIFICA QUE:

La empresa: Edith Mariela Burbano Rosero - Identificada con NIT 59835393, Dirección Universidad de Nariño- Edificio Tecnológico Laboratorio 604, por medio de la empresa EMPRESA METROPOLITANA DE ASEO DE PASTO, Identificación: 814001299 – Dirección: Cra 24 23 - 1300, Tel: 7363468, entregó el material que fue recibido de acuerdo con las siguientes especificaciones:

FECHA RECEPCIÓN	SOLICITUD	NOMBRE TÉCNICO / NOMBRE DECLARADO	CORRIENTE A – Y	MANEJO	FECHA/PLANTA	PESO kg
FEBRERO 2019	57740 57991 58383 58609 59044 59294	RESIDUOS BIOSANITARIOS / RESIDUOS BIOSANITARIOS	A4020-Y1	Ecoesteryl	FEBRERO 2019 PARQUE TECNOLÓGICO AMBIENTAL DE OCCIDENTE	34

El material que se certifica, fue tratado de acuerdo con las licencias ambientales aprobadas para TECNOLOGÍAS AMBIENTALES DE COLOMBIA S.A.S. E.S.P.

TECNIAMSA NACIONAL: Nit. 805.001.538-5

1. Resolución 0100 No. 0150-0693 del 31 de agosto de 2018 que autoriza el almacenamiento, tratamiento y aprovechamiento de residuos peligrosos.
2. Resolución No. 141 del 4 de febrero del 2013 con sus modificaciones, expedida por la COPORACIÓN AUTÓNOMA REGIONAL DE CUNDINAMARCA – CAR. Que autoriza disposición final en celda y planta de tratamiento de aguas residuales.
3. Resolución No. 462 del 26 de agosto de 2009 con sus modificaciones, expedida por la CORPORACIÓN AUTÓNOMA REGIONAL DEL ATLÁNTICO – CRA. Que autoriza el tratamiento térmico, disposición final en celda y aprovechamiento de RESPEL.
4. Resolución No. 2988 del 11 de diciembre de 2018, resolución No. 248 del 17 de junio de 2015 con sus modificaciones y Resolución No. 292 del 31 de agosto 2009, expedida por la CORPORACIÓN AUTÓNOMA REGIONAL DE CALDAS-CORPOCALDAS que autoriza el tratamiento térmico por incineración y autoclave.

La presente certificación se expide a los 7 día(s) del mes de marzo de 2019. Cualquier información adicional relacionada con este certificado, se encuentra disponible para consulta en las instalaciones de TECNOLOGÍAS AMBIENTALES DE COLOMBIA S.A.S. E.S.P. – TECNIAMSA.

Cordialmente,

Oscar Fernando Álvarez
Director nacional de operaciones



San Juan de Pasto, 31 de marzo de 2019

MAR5016540

ACTA DE TRATAMIENTO RESIDUOS HOSPITALARIOS Y SIMILARES**Edith Mariela Burbano Rosero NIT:****Universidad de Nariño- Edificio Tecnológico Laboratorio 604 - Pandiaco Ciudad Pasto****Nit: 59835393**

SALVI LTDA, empresa encargada y autorizada de realizar la recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos hospitalarios y similares, con Nit. 814.003.167-8, ubicada en la Carrera 36 No. 3 oeste – 05 y planta de tratamiento en el kilómetro 11 Vía Oriente.

CERTIFICA QUE:

En el periodo: del 01 de Marzo al 31 de Marzo de 2019

Recolectados de: Edith Mariela Burbano Rosero

Transporto (cantidad): 6 kilos de residuos peligrosos generados en la atención de la salud y otras actividades.

TRATADOS	
REFERENCIA	CANT
BIOSANITARIOS	6
TRANSPORTADOS	
ANATOMOPATOLOGICOS	
CORTOPUNZANTES	0
FARMACOLOGICOS	
ANIMALES	
OTROS	
TOTAL	6

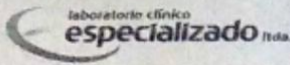
Los residuos Biosanitarios fueron desactivados mediante el tratamiento de esterilización de alta eficiencia, Autorizado mediante licencia ambiental No 552 de 2011 expedida por la Corporación Autónoma Regional de Nariño, para luego ser dispuestos en el relleno sanitario.

Según contrato celebrado entre las partes.

CLARA NIDIA ROLDAN U.
Gerente SALVI LTDA.

NOMBRE Y CEDULA DEL CLIENTE
FECHA DE ENTREGA:
No DE ACTAS

Nota: el ACTA DE INCINERACIÓN emitida por nuestra empresa aliada, se anexa si el generador produce residuos anatomopatológicos y/o cortopunzantes.

	COMUNICACIONES EXTERNAS	CODIGO: F-GE-07/02
		VERSION: 03
		FECHA: JUNIO 7 DE 2016

Comunicación SGC 02-18

San Juan de Pasto, febrero 2 de 2018



Respetado Señor:
GUILLERMO CASTILLO BELALCAZAR
 Director Programa de Biología
 Universidad de Nariño
 Ciudad.

Reciba un Cordial saludo.

En atención a la solicitud realizada por parte de Ustedes, para la colaboración en la búsqueda de la especie bacteriana *Escherichia coli* con resistencia a antibióticos provenientes de ambientes clínicos, me permito comunicarle nuestro apoyo a la estudiante del programa de maestría en Ciencias Biológicas: Deisy Lorena Guerrero.

Los aislamientos que sean de la utilidad para el estudio, serán notificados mediante llamada al celular de la estudiante, para que sean recolectados en la sede de este Laboratorio. Realizaremos un procedimiento de entrega del espécimen únicamente a la persona asignada, para que la misma sea la responsable de su transporte, manejo, proceso y descarte en las instalaciones de la Universidad de Nariño.

Laboratorio Clínico Especializado Ltda., no adquiere ninguna responsabilidad laboral sobre la estudiante Deisy Lorena Guerrero, pues se trata de un apoyo interinstitucional para el fin citado.

Atentamente,


SARA RECALDE MORILLO
 GERENTE

Pdo. Juan
 05 JUN 2018
 3:40 pm



Juan Carlos Salcedo Reyes <editorus@javeriana.edu.co>

Lun 9/09/2019 12:20 PM

Usted ↕



Deisy Lorena Guerrero Ceballos:

Thank you for submitting the manuscript, "Identification of antibiotic-resistant Escherichia coli linked to urinary infections" to Universitas Scientiarum. With the online journal management system that we are using, you will be able to track its progress through the editorial process by logging in to the journal web site:

Manuscript URL: <https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/authorDashboard/submission/27127>

Username: deisguerrero

If you have any questions, please contact me. Thank you for considering this journal as a venue for your work.

Juan Carlos Salcedo Reyes