

Caracterización molecular de genes de resistencia mcr-1 en aislamientos de E. coli resistentes a colistina de instituciones de tercer nivel en Colombia.

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico

Trabajo de grado

Bogotá, 3 de septiembre de 2021



Caracterización molecular de genes de resistencia mcr-1 en aislamientos de E. coli resistentes a colistina de instituciones de tercer nivel en Colombia.

Mateo Mahecha López
Ana María Velandia López

Asesora interna

Gladys Pinilla Bermúdez MSc. en Química con énfasis en Biología Molecular

Asesora externa

Elsa Piedad De La Cadena Vivas MSc. en Ciencias Biomédicas

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico

Trabajo de grado

Bogotá, 3 de septiembre de 2021



Caracterización molecular de genes de resistencia mcr-1 en aislamientos de E. coli resistentes a colistina de instituciones de tercer nivel en Colombia.

APROBADA _____

JURADOS _____

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico

Trabajo de grado

Bogotá, 3 de septiembre de 2021

Tabla de contenido

1. Planteamiento del problema	8
2. Objetivos	9
2.1 Objetivo general	9
2.2 Objetivos específicos	9
3. Justificación	10
4. Marco teórico	12
4.1 Antecedentes	12
4.2 Bases teóricas	21
4.2.1 Resistencia bacteriana	21
4.2.2 Polimixinas	23
4.2.3 Mecanismos de resistencia a polimixinas	24
4.2.4 Detección de genes <i>mcr-1</i> implicados en la resistencia a polimixinas	25
4.2.5 Plásmidos implicados en la diseminación de genes <i>mcr-1</i>	26
4.2.6 <i>Escherichia coli</i>	27
4.2.7 Clones de alto riesgo	28
4.2.8 Relación entre genes <i>mcr-1</i> y otros genes de resistencia	29
4.2.9. Multilocus sequence typing (MLST)	30
4.2.10 Métodos para evaluar la susceptibilidad a polimixinas	31
4.3 Marco legal	32
5. Diseño metodológico	33
5.1 Tipo de investigación	33
5.2 Impacto de la investigación	33
5.3 Población y criterios de inclusión	33
5.4 Técnicas y procedimientos	34

5.4.1 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	34
5.4.2 Identificación molecular de genes <i>mcr-1</i> y otros genes de resistencia	37
5.4.3 Electroforesis de Campos Pulsados (PFGE) para estudio de clonalidad molecular	38
5.4.4 Secuenciación de Genoma Completo	38
5.4.5 Análisis de bioinformática	39
5.4.6 Plan de análisis de datos	40
6. Resultados	40
6.1 Confirmación de resistencia a colistina	40
6.2 Detección de genes <i>mcr-1</i>	42
6.3 Análisis fenotípico de susceptibilidad antibiótica	43
6.4 Análisis de clonalidad	43
6.5 Análisis de secuencias de genoma completo	44
6.5.1 Genes de virulencia	45
6.5.2 Plásmidos de incompatibilidad	45
6.5.3 Resistoma	46
6.5.4 Entorno genético de <i>mcr-1</i>	47
7. Discusión	47
8. Conclusiones	51
9. Referencias bibliográficas	52

Lista de tablas

Tabla 1. Especificaciones de la PCR convencional para la detección de *mcr-1*.
37

Tabla 2. Datos demográficos y resultados de la prueba de CBDE de 32
aislamientos. 41

Tabla 3. Susceptibilidad a antibióticos de los aislados portadores de *mcr-1* (CIM
mg/l) 43

Tabla 4. Determinación de grupos filogenéticos y MLST 44

Tabla 5. Genes de virulencia detectados en aislamientos portadores de *mcr-1*
45

Tabla 6. Identificación de genes asociados a la resistencia antimicrobiana 46

Lista de figuras

Figura 1. Resultado de la PCR para identificación de genes *mcr-1* 43

Figura 2. Dendograma. 44



Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Bacteriología y laboratorio clínico

Caracterización molecular de genes de resistencia mcr-1 en aislamientos de E. coli resistentes a colistina de instituciones de tercer nivel en Colombia.

Resumen

La resistencia bacteriana es un problema de carácter mundial que pone en riesgo la salud humana y agota las opciones terapéuticas contra bacterias patógenas multiresistentes a los antibióticos. La resistencia a la colistina estaba asociada a mutaciones cromosomales, sin embargo, en el año 2015 reportaron por primera vez el gen *mcr-1* que genera resistencia a polimixinas a través de plásmidos. Después de este, se han realizado reportes prácticamente por todo el mundo, asociados tanto a aislamientos de origen animal como humanos. En Colombia fue detectado por primera vez en el año 2016 en tres aislamientos de *Salmonella entérica* serovar *Typhimurium* y un aislamiento de *E. coli*. En esta investigación se estudiaron 32 aislados de *E. coli* recolectados de instituciones hospitalarias de tercer nivel en Colombia con el objetivo

de determinar las características genéticas y fenotípicas de resistencia. De los 32 aislamientos estudiados, se confirmaron 7 como resistentes a colistina por metodología CBDE. La PCR mostro que 5 de los 7 aislados portaban genes *mcr-1*, uno de estos con fenotipo BLEE resistente a ceftriaxona, cefotaxime y susceptibilidad reducida a ceftazidime y confirmación de CTXM-55 por SGC. Dos aislamientos presentaron clonalidad del 100% por PFGE, la mayoría de aislados con grupo filogenético B1 y dos compartiendo el mismo MLST, se detectaron distintos plasmidos con predominio IncFII y dentro de su entorno genético se pudo identificar un aislado portando *mcr-1* posiblemente en un plasmido tipo IncI.

PALABRAS CLAVES: Colistina, *mcr-1*, Resistencia bacteriana, *E. coli*

Estudiantes.

Mateo Mahecha Lope
Ana María Velandia López

Docentes.

Msc. Elsa Piedad De La Cadena Vivas
Msc. Gladys Pinilla Bermúdez

Bogotá, 3 de septiembre 2021

1. Planteamiento del problema

Diversos estudios habían demostrado que la resistencia a polimixinas se debía exclusivamente a mutaciones en el cromosoma que generaban modificaciones en el lipopolisacarido (LPS) de las bacterias Gram negativas, siendo el responsable de la resistencia a este grupo de antibióticos empleados en algunas ocasiones como último recurso en infecciones causadas por bacilos Gram negativos. Esto hasta el año 2015, cuando se reportó por primera vez un gen denominado *mcr* (mobile colistin resistance) que tiene la capacidad de diseminarse de manera vertical y horizontal de una bacteria a otra confiriendo resistencia a polimixinas. Sumado a esto las bacterias resistentes a polimixinas portadoras de *mcr* también pueden expresar varios mecanismos que les confieren resistencia a otras familias de antibióticos de importancia clínica considerándolos, así como microorganismos multidrogoresistentes (MDR), difíciles de tratar y por ende causantes de graves complicaciones en los pacientes.

En Colombia han sido pocos los estudios realizados para determinar la presencia de cepas resistentes a colistina mediada por genes *mcr1* que además presenten resistencia al arsenal terapéutico que se emplea en este país para infecciones causadas por bacilos Gram negativos. Existen dificultades para el tamizaje de la susceptibilidad a polimixinas, adicionalmente debido a las altas tasas de resistencia que presenta Colombia a otros grupos de antibióticos el aumento de la resistencia a polimixinas asociados a la diseminación de genes *mcr-1* podría crear un problema mayor de salud pública, especialmente si estos genes se insertaran en clones de alto riesgo como el ST131 o ST405 descritos previamente en el país y que presentan una mayor diseminación.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Identificar el contexto genético de resistencia en aislamientos clínicos de *E. coli* portadores de genes *mcr-1* en instituciones de tercer nivel en Colombia recolectados del año 2017 al 2018

2.2 Objetivos específicos

- Determinar el perfil fenotípico de susceptibilidad a diferentes grupos de antimicrobianos en aislamientos resistentes a colistina portadores de *mcr-1*.
- Identificar las características genéticas de los aislamientos portadores de genes *mcr-1* (factores de virulencia, MLST, grupo filogenético, genes acompañantes).
- Identificar si la aparición de aislamientos portadores de genes *mcr-1* está asociada a clones de alto riesgo.

3. Justificación

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema de carácter mundial que pone en riesgo la salud humana y agota las opciones terapéuticas contra bacterias patógenas MDR. Estos fenómenos de resistencia se producen por diversos mecanismos, como son las mutaciones cromosomales o la resistencia mediada por plataformas o elementos genéticos móviles (plásmidos, transposones e integrones), los cuales portan genes de resistencia que pueden diseminar fácilmente de una bacteria a otra. Esto último supone un mayor problema debido a que estos mecanismos se diseminan rápidamente entre poblaciones bacterianas como ha sido el caso de *bla*_{KPC} y *bla*_{NDM}, genes que confieren resistencia a la mayoría de los β-lactámicos, y que se han diseminado rápidamente por todo el mundo asociados a ciertos clones de alto riesgo como el ST258 en el caso de *bla*_{KPC}. Adicionalmente, estas plataformas suelen llevar otros genes de resistencia a otros grupos de antibióticos dejando pocas opciones de tratamiento. En estos casos durante años se ha recurrido a las polimixinas como último recurso, sin embargo, con preocupación también se ha reportado un incremento en la resistencia a este grupo.

La resistencia a colistina estaba asociada a mutaciones cromosomales, sin embargo, en el año 2015 en China Liu et al., (1) reportaron por primera vez el

gen *mcr-1* que genera resistencia a las polimixinas, un grupo de antibióticos utilizados para el tratamiento de bacterias Gram negativas resistentes a otros fármacos y que se disemina a través de plásmidos. Esto generó una gran preocupación debido a que hasta ese momento la resistencia a estos antibióticos se asociaba únicamente a modificaciones en el cromosoma, especialmente en los sistemas reguladores de dos componentes *pmrAB*, *phoPQ* y *mgrB* que afectan el lípido A del LPS, advirtiendo a la comunidad científica y médica sobre la posible propagación de este mecanismo de resistencia.

Después del reporte inicial, se han realizado reportes prácticamente por todo el mundo, tanto en aislamientos de origen animal como humanos. En Colombia según datos del Instituto Nacional de Salud (INS) el gen *mcr-1*, fue detectado por primera vez en el año 2016 en tres aislamientos de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium de pacientes procedentes de Antioquia, Bogotá y Boyacá; y un aislamiento de *E. coli* en una paciente de Santander. En el año 2017 un estudio realizado por Saavedra et al.,(2) sobre la *Caracterización genómica y molecular de aislados clínicos de Enterobacteriaceae albergando mcr-1 en Colombia, 2002 a 2016*, de un total de 5.887 aislamientos recuperados de 9 hospitales ubicados en 7 regiones distintas de Colombia, encontró 12 (2.3%) aislados positivos para el gen *mcr-1* (8 de *E. coli*, 3 de *S. Typhimurium* y 1 de *Klebsiella pneumoniae*), evidenciando la presencia del gen en el país.

Esta investigación pretende identificar las características fenotípicas y moleculares de estos genes en aislamientos de *E. coli* en años recientes y su posible relación con clones de alto riesgo que podrían permitir la rápida diseminación de estos genes de resistencia en infecciones de origen hospitalario o provenientes de la comunidad. La información obtenida puede servir de base para implementar medidas de vigilancia y control a nivel de comités de infecciones. Adicionalmente, fomenta lazos de cooperación entre la Universidad El Bosque, su grupo de Resistencia Antimicrobiana y Epidemiología Hospitalaria (RAEH) y la Universidad Colegio Mayor de

Cundinamarca abriendo un campo de investigación de gran relevancia actualmente y que impacta de gran manera a nuestro país. Este proyecto es viable en costos, y cuenta con el apoyo y dirección profesional de la Dra. Gladys Pinilla Bermúdez líder del Grupo de Investigación REMA de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y la Dra. Elsa De La Cadena Vivas docente investigador que pertenece al Grupo RAEH de la Universidad El Bosque los cuales proveen materiales, laboratorios y experiencia investigativa para realizar este proyecto.

4. Marco teórico

4.1 Antecedentes

El primer reporte del gen *mcr-1* que confiere resistencia a la colistina en *E. coli* asociado a un plásmido en China, causó gran preocupación. Los mecanismos de resistencia descritos hasta entonces se debían a mutaciones en genes relacionados con la producción de enzimas que afectan el LPS, estas mutaciones cromosomales se transfieren de manera vertical lo que disminuye la velocidad de diseminación y lo restringe a la misma especie. Un mecanismo de resistencia mediado por plásmidos puede transferirse vertical y horizontalmente, lo que le permite hacerlo de una manera más rápida, incluso entre bacterias de diferente especie (1). Velasco et al., en su publicación *First report of the mcr-1 colistin resistance gene identified in two Escherichia coli isolates from clinical samples, Philippines, 2018*, reportó un primer estudio con 123 aislados resistentes a múltiples fármacos recolectados de un hospital de Filipinas en 2018. En estos aislamientos se identificaron dos aislados clínicos de *E. coli* positivos para *mcr-1* de diferentes pacientes, los cuales eran albergados en plásmidos IncL2. También se encontró un aislado que portaba adicionalmente 12 genes de resistencia a diversos antimicrobianos además de *mcr-1*(3).

En un estudio realizado en Bangladesh por Amin et al., (4) donde se incluyeron aislados de *E. coli* productoras de BLEE recuperados de heces de aves de corral obtenidas del 2017 al 2018 para determinar la resistencia a la colistina. Se encontró que de los 104 aislados, 98 (94.2%) tenían una concentración mínima inhibitoria (CMI) a colistina ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ y 14 (13.5%) fueron positivos para *mcr-1*. Este estudio mostró una prevalencia del 13.5% de *E. coli* productoras de BLEE positivas para el gen *mcr-1* en muestras fecales de aves de corral en Bangladesh.

Varios estudios han reportado la coexistencia de genes *mcr* BLEE en cepas bacterianas provenientes de aves de corral. El estudio realizado por Vounba et al., (5) en el año 2019, tuvo como objetivo investigar la prevalencia de la resistencia a la colistina y de los genes *mcr-1* y *mcr-2* aislados de materia fecal de pollos sanos ubicados en Canadá, Senegal y Vietnam. Se recuperaron un total de 327 aislamientos de *E. coli* productoras de BLEE/AmpC, de los 327 aislamientos 13 fueron resistentes a colistina, 2 de Senegal sin presencia de gen *mcr* pero con un polimorfismo que produce una variante en la proteína PmrA (S29G) y dos polimorfismos que producen variantes en la proteína PmrB (P94L y D283G). El gen *mcr-1* solo se detectó en los otros 11 aislados de Vietnam. Esto demostró la presencia de resistencia a la colistina asociada al gen *mcr* en cepas de *E. coli* productoras de BLEE/AmpC en granjas de pollos ubicadas en Senegal y Vietnam, pero no en Canadá.

La resistencia a la polimixina se origina principalmente por la remodelación estructural del lípido A de la superficie bacteriana. Zhang et al.,(6) en su publicación, *Genetic and Biochemical Mechanisms for Bacterial Lipid A Modifiers Associated with Polymyxin Resistance* concentran su estudio en aspectos bioquímicos y genéticos de tres sistemas modificadores de LPS asociados a la resistencia a polimixinas: ArnT, EptA y AlmEFG. Este último sistema únicamente se encuentra en el biotipo El Tor de *Vibrio cholerae* O1. ArnT es una glicosiltransferasa regulada por el sistema PmrA, que cataliza la adición de grupos covalentes 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa (L-Ara4N) al lípido

A de la membrana externa de las bacterias. EptA a través de diferentes reacciones une fosfatidiletanolamina (PEA) al lípido A, esta adición de PEA también se asocia con la modificación de LPS mediado por el gen de resistencia a la colistina *mcr-1*.

Una de las dificultades para el uso de las polimixinas han sido los problemas para evaluar su susceptibilidad en el laboratorio. Ezadi et al., (7) sugieren que es necesario el desarrollo de un método óptimo y confiable para evaluar la susceptibilidad de los aislados a las polimixinas que garantice el tratamiento adecuado del paciente. Factores como la composición de las polimixinas, la mala difusión en agar las mismas, la adherencia a placas de titulación y el efecto de sinergismo que genera el polisorbato 80 dificultan la realización de pruebas confiables. Pruebas de susceptibilidad como la difusión con disco y el método de gradiente no son útiles, debido al gran tamaño de la molécula lo que dificulta su difusión en el agar, dejando a la microdilución en caldo como una de las opciones más viables para la *evaluación in vitro* de la susceptibilidad a este antimicrobiano.

El método de elución en caldo con disco de colistina por sus siglas en inglés "CBDE" se describió como un método simple y preciso para realizar pruebas de susceptibilidad a la colistina. Además, el conocimiento de que las enzimas MCR requieren zinc para su actividad, permitió que en el año 2019 Bell et al., (8) realizaran un estudio para optimizar la funcionalidad de la prueba CBDE, permitiendo diferenciar si la resistencia a colistina se debía a la presencia de genes *mcr* basado en la reducción de la CMI en presencia de EDTA, un conocido quelante de zinc. De esta manera evaluaron ochenta y cinco aislados del orden *Enterobacterales*, incluidos 12 aislados productores de MCR. El CBDE se realizó en paralelo con el método CBDE más EDTA a concentraciones de EDTA de 1 mM, 2 mM y 5 mM. Los doce aislamientos que portaban genes *mcr* mostraron una reducción en la CMI cuando se añadió EDTA al caldo de cultivo, mientras que sólo 3 / 73 de las cepas que no portaban *mcr* mostraron una reducción. Este estudio sugiere que la

metodología CBDE-EDTA es un método eficaz para detectar la presencia de *mcr* en aislamientos resistentes a colistina utilizando reactivos de bajo costo y alta disponibilidad. El *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) incorporó en su guía M100, 2020 la recomendación para realizar la prueba de CBDE como prueba para confirmar la resistencia a colistina.

Lerminiaux et al., (9) se reportó que la transferencia horizontal de genes conlleva a la rápida propagación de mecanismos de resistencia en bacterias. Mecanismos como la conjugación por plásmidos, la transducción por bacteriófagos y la transformación natural por la adquisición de ADN extracelular, permiten que los genes se transfieren de bacteria a bacteria e incluso de un género a otro. Revisando varios casos concluyen que la transferencia horizontal de genes de resistencia se da en mayor medida por el mecanismo de conjugación. Este mecanismo requiere del contacto entre dos células para que posteriormente se haga la transferencia del plásmido que tiene la célula donante a una célula que recibe dicho plásmido, sin embargo, no se descarta que los otros métodos no sean usados por las bacterias. La transmisión horizontal de genes de resistencia impulsa el desarrollo de las denominadas “superbacterias” que deben ser estudiadas al detalle para reducir su aparición especialmente en unidades de cuidados intensivos y otros entornos clínicos.

Tarabai et al., (10) describen la primera detección de resistencia a la colistina mediada por plásmidos en la vida silvestre rusa en un aislado de *E. coli* perteneciente al tipo de secuencia (ST) 2280 de un ave rapaz carroñera (Milano negro - *Milvus migrans*). El aislado fue susceptible a todos los antibióticos probados, excepto a la colistina, el análisis de secuenciación del genoma completo (SGC) y los experimentos de transferencia mostraron que el gen *mcr-1* estaba localizado en el plásmido pDR164 de IncI2. Los milanos negros pueden actuar como reservorios y vectores de bacterias resistentes a los antibióticos que pueden diseminarse a través de sus largas vías migratorias. Este gen parece estar diseminado globalmente en los sectores

veterinario, clínico y medioambiental gracias a diferentes factores naturales como la migración de las aves.

Desde el descubrimiento del gen *mcr-1* en 2015, el número de aislamientos portadores de este gen ha aumentado en todo el mundo a un ritmo alarmante. Nang et al.,(11) indican que este gen se ha detectado en 47 países de 6 continentes, entre estos Colombia, Argentina, Brasil y Ecuador en América del sur. El ganado se considera el principal reservorio de *mcr* debido al uso intensivo de polimixinas con fines profilácticos, metafilaxis y terapéuticos. La transferencia de plásmidos portadores de *mcr* de aislamientos de origen animal a humanos se demostró mediante pruebas de conjugación y transformación in vitro, que muestran la transferencia exitosa de *mcr-1* en un plásmido (pHNSHP45) de cerdo a enterobacterias patógenas humanas comunes y *Pseudomonas aeruginosa*. No obstante, la prevalencia de *mcr* es mucho mayor en el ganado en comparación con los humanos. Afortunadamente el uso de colistina con fines agrícolas ha sido prohibido recientemente en varios países como China y Brasil.

Wu et al.,(12) realizaron un estudio sobre la prevalencia de genes BLEE/*mcr-1* en pollos de diferentes provincias de China del 2008 al 2014. Encontraron que 341 de 821 aislamientos eran cepas con BLEE, siendo CTX-M el tipo más prevalente (92,7%). También observaron que 44 de las 341 cepas de *E. coli* con múltiples ST (ST46, ST1286, ST10, ST29, ST101 y ST354) portaban *mcr-1*, y la mayoría de los plásmidos portadores de *mcr-1* eran IncI2. El análisis de SGC indicó la coexistencia de *bla*_{CTX-M} y *mcr-1* en cepas tanto de origen animal como humano, y el análisis filogenético reveló aún más su estrecha relación, especialmente varios aislados que compartían una pequeña cantidad de *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), lo que sugiere la tendencia creciente de coexistencia y transmisión de BLEE y *mcr-1* tanto en el medio hospitalario como el veterinario.

La aparición de cepas resistentes a antibióticos que en algunos casos podrían considerarse de último recurso se está convirtiendo en un problema crítico en varios países. En el trabajo titulado *Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms*, Jeannot et al., (13), revisan diferentes mecanismos que utilizan algunas enterobacterias utilizando la expresión de genes de la vía de modificación del LPS que están bajo el control de una variedad de sistemas de dos componentes o por sus siglas en inglés (two component system - TCS) como PhoP-PhoQ (PhoPQ) y PmrA-PmrB (PmrAB). Este último regula la glicosiltransferasa ArnT para la posterior adición de L-Ara4N al lípido A. Estos sistemas están sujetos a autofosforilación en condiciones de estrés específicas, y un regulador de respuesta citoplasmática afín que cuando es fosforilada por una quinasa a su vez modula la expresión de genes diana que regulan el cambio del lipopolisacárido A para la eventual resistencia a polimixinas. Así mismo se evidenció una preocupación por la ubicación de genes *mcr* en plásmidos transferibles como pHNSHP45 (gen *mcr-1*, IncI2; 64105 pb) y pKP37-BE (gen *mcr-2*, IncX4; 35104 pb), que pueden propagarse fácilmente por conjugación entre cepas de *E. coli* y, además, pHNSHP45 podría transmitirse a *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* mediante transformación in vitro.

El gen *mcr-1* se ha identificado en todo el mundo en varias especies de *Enterobacterales*. Liu et al.,(14) determinaron los efectos de *mcr-1* sobre la susceptibilidad a la colistina y sobre las estructuras de LPS en cepas clínicas y de laboratorio pertenecientes al grupo denominado ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacter spp.*). Plásmidos recombinantes portadores de *mcr-1* se introdujeron y se mantuvieron con éxito en todas las especies analizadas. La CMI de colistina se elevó con la inserción de *mcr-1*, y aumento de 16 a 32 veces en *E. coli*, de 32 a 256 veces en *K. pneumoniae*, de 64 a 128 veces en *A. baumannii* y de 2 a 4 veces en *P. aeruginosa*. En el análisis de la estructura del LPS, encontraron que la gran mayoría de cepas tenían una modificación con PEtN (Fosfoetanolamina) en el lípido A de las bacterias.

Luo et al., (15) realizaron un estudio de vigilancia epidemiológica molecular de la resistencia a la colistina en aislados clínicos de *E. coli*, tanto en aislados positivos como negativos para *mcr*. Se obtuvieron 1270 cepas de *E. coli* del *First Affiliated Hospital* (Universidad de Zhejiang, Hangzhou, China) entre enero de 2014 y marzo de 2015, ninguno de los pacientes había sido tratado con colistina y tampoco habían viajado al extranjero. Identificaron 40 (3,15%) aislados resistentes, incluidos 21 aislamientos positivos para *mcr-1*. Encontraron que *bla*_{CTX-M-55} era la variante más común entre los aislados positivos para *mcr* productores de BLEE, lo que muestra una posible transmisión de animal a humano. El gen se transportaba en plásmidos de varios tamaños fácilmente transferibles a una cepa receptora in vitro.

La amplia distribución de *mcr-1* en *E. coli* aisladas de humanos y ganado en China presagia un problema de diseminación de la resistencia. El laboratorio nacional de referencia para patógenos bacterianos entéricos en Inglaterra y Gales (GBRU) recibe aislados bacterianos de origen clínico y fuentes de alimentos para su caracterización desde abril de 2014. Este servicio de rutina incluía SGC. Doumith et al.,(16) examinaron las secuencias de *Salmonella spp.*, *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Campylobacter spp.*, y *Shigella spp.*, de aislados humanos y de alimentos del GBRU, e identificaron 15 aislados de *Salmonella* con el gen *mcr-1* (13 aislados de humanos y 2 aislados de carne de aves de corral), y 3 aislamientos de *E. coli* aislados de 2 pacientes. El gen *mcr-1* se localizó en diversos plásmidos pertenecientes a los tipos de replicón IncHI2, IncI2 e IncX4, y se determinó que este gen ha estado presente en *E. coli* y *Salmonella spp.*, aislados de humanos en Inglaterra y Gales desde al menos 2012.

En la investigación *Dissemination and Mechanism for the MCR-1 Colistin Resistance* realizada por Gao et al., (17) concluyen que la dispersión global de *mcr-1* podría estar relacionada con una vía basada en la cadena alimentaria. Se obtuvieron aislados de *E. coli* de pacientes con diarrea

proporcionados por el Centro de Shenzhen para el Control de Enfermedades. Aislaron plásmidos que albergaban *mcr-1* a partir de *E. coli* obtenidas de la microbiota intestinal de estos pacientes. Determinaron que un plásmido de tipo IncI2 portaba un gen *bla*_{CTX-M-55}, observando la posible co-existencia con *mcr-1* en muestras de carne, destacando con preocupación la posibilidad de que estén surgiendo microorganismos extremadamente-multidrogoresistentes (XDR).

Wang et al., (18) mostraron los diferentes reservorios de plásmidos que albergan *mcr-1*. Para ello estudiaron poblaciones de cerdos en tres granjas, tomando muestras de fluidos nasales y heces de cerdos de engorde. De las 1026 muestras de *E. coli* se determinó que 302 aislados eran positivos para *mcr-1*, encontrándose una complejidad no esperada en los plásmidos que albergan *mcr-1*. También se realizó la tipificación de secuencias de múltiples locus (MLST) que arrojó no menos de 11 STs, incluido un nuevo ST.

La organización panamericana de la salud (OPS) y la Organización mundial de la salud (OMS) emitieron una alerta epidemiológica en el año 2016 titulada *Enterobacterias con resistencia transferible a colistina, Implicaciones para la salud pública en las Américas*, ante la detección en varios países de la región de microorganismos con mecanismos de resistencia a la colistina a través de plásmidos portadores de *mcr-1*, aislados tanto en animales como en humanos llamando la atención sobre la necesidad de realizar una vigilancia activa frente a este mecanismo(19).

En el artículo *Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections* publicado por Falagas et al., (20) hacen una revisión del mecanismo de acción, la toxicidad como principal efecto secundario y la importancia de la terapia combinada con otros antibióticos. A pesar de que no hay suficiente evidencia en cuanto a la actividad sinérgica de la colistina con otros antimicrobianos, encontraron un ensayo clínico que demostraba la eficacia de la colistina, evaluando a 53 pacientes con

fibrosis quística con exacerbaciones de infecciones pulmonares crónicas debidas a *P. aeruginosa* MDR. Este estudio mostró que la combinación de colistina con un agente antipseudomonas (azlocilina, piperacilina, aztreonam, ceftazidima, imipenem o ciprofloxacina) fue más eficaz que la monoterapia con colistina.

4.2 Bases teóricas

4.2.1 Resistencia bacteriana

La resistencia a los antimicrobianos se ha vuelto un problema de salud pública a nivel mundial, dejándonos sin opciones terapéuticas eficaces y seguras. La resistencia a los carbapenémicos, β -lactámicos de amplio espectro en los patógenos Gram negativos representa un mayor problema ya que estos antimicrobianos se han considerado por mucho tiempo los β -lactámicos más activos contra bacterias MDR (21). La OMS, incluyó en la lista de patógenos prioritarios de bacterias resistentes a los antibióticos publicada en el año 2017 a los *Enterobacterales* resistentes a los carbapenémicos y aquellos portadores de BLEES, designándolos como prioridad crítica para la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos (22).

Las BLEES son enzimas que hidrolizan penicilinas y cefalosporinas hasta de tercera generación (3G), y son responsables en gran medida de la resistencia a este grupo de antimicrobianos en *E. coli* y *K. pneumoniae*. Según datos del INS publicados en 2019, la resistencia a cefalosporinas de 3G en Colombia en *K. pneumoniae* estuvo en un rango entre 25,3% y 34,7%; y osciló entre un 14,5% y 31% en *E. coli* durante el 2018(23). Por otra parte, la resistencia a otros grupos de antimicrobianos, como las fluoroquinolonas, antibiótico muy utilizado en el tratamiento de infecciones urinarias causadas por *E. coli* ha aumentado de manera exponencial a nivel mundial, alcanzando tasas casi del 50% en muchos países (24). Debido a las altas tasas de resistencia a cefalosporinas de 3G principalmente por la adquisición de BLEES, y a que muchos de estos

microorganismos son resistentes a otros grupos de antibióticos debido a la adquisición de otros genes de resistencia o mutaciones cromosomales, los carbapenémicos se han constituido en una opción para el tratamiento de estas infecciones(25).

Los carbapenémicos se han utilizado por muchos años para tratar infecciones por bacterias MDR, sin embargo, la resistencia a estos antibióticos ha ido en aumento globalmente. Dentro de estos, *K. pneumoniae* es uno de los principales patógenos causantes de infecciones nosocomiales, como la neumonía, sepsis, infecciones en recién nacidos y especialmente en unidades de cuidado intensivo. Debido a la resistencia estos antimicrobianos ya no son eficaces en más de la mitad de los pacientes con infecciones por *K. pneumoniae*(26). Un estudio multicéntrico realizado del 2013 al 2014, El *European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* (EuSCAPE) encontró una prevalencia del 37% de resistencia a carbapenémicos por carbapenemasas en *K. pneumoniae* y del 19% en *E. coli*(27). En Colombia datos del INS muestran una resistencia a carbapenémicos del 15% en *K. pneumoniae*, considerándose Colombia un país endémico para carbapenemasas tipo KPC (23). Debido a estas altas tasas de resistencia y la falta de opciones terapéuticas se ha tenido que recurrir en los últimos años a antibióticos denominados de último recurso, que tienen más efectos no deseados pero que tienen baja tasa de resistencia como las polimixinas(28).

La colistina fue considerada por muchos años como un antimicrobiano de último recurso. Se utilizó en Japón y Europa durante la década de 1950, y en el año 1959 la agencia de Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de EEUU aprobó el colistimetato (CMS) profármaco inactivo de la colistina, de administración parenteral. La colistina y la CMS se han utilizado ampliamente durante décadas para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram negativas MDR. Sin embargo, en la década de 1970, debido a su toxicidad, especialmente nefrotoxicidad, se reconsideró su uso. Posteriormente, fueron reemplazados por antibióticos nuevos, más activos y menos tóxicos,

como los aminoglucósidos, β -lactámicos como los carbapenémicos y fluoroquinolonas (29,30). A pesar de esto, el creciente aumento de bacterias Gram negativas MDR, en particular *K. pneumoniae*, *E. coli*, *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, obligó a reintroducir las polimixinas como una opción terapéutica valiosa (30). Afortunadamente, desde el 2015 se han aprobado nuevos inhibidores, que unidos a β -lactámicos tradicionales son estables a la acción de la mayoría de las carbapenemasas, y ha llevado a que actualmente no se aconseje el uso de polimixinas, excepto cuando no haya más opciones, y nunca como monoterapia (31).

4.2.2 Polimixinas

Existen 5 tipos de polimixinas, de la A a la E, únicamente la polimixina B y la polimixina E conocida como colistina son usadas en la práctica clínica y veterinaria (32). La colistina y la polimixina B se diferencian por un solo aminoácido en el anillo peptídico, con una fenilalanina en la polimixina B y una leucina en la colistina (29). Estas polimixinas están conformadas por péptidos policatiónicos que básicamente tienen un heptapéptido cíclico, un segmento de tripéptido lineal y una cola de ácido graso unida al extremo N del tripéptido. Las polimixinas aumentan la permeabilidad de la membrana externa fijando su porción catiónica (polipéptido) a la porción aniónica de la membrana celular de bacilos Gram negativos. El LPS se desestabiliza debido al desplazamiento de cationes tales como calcio (Ca^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}) generando cambios en la permeabilidad de las membranas celulares de las bacterias; posteriormente se da la fuga de todo el contenido citoplasmático y por ende se produce la muerte celular (17). A pesar de que el LPS es el objetivo de este antimicrobiano, el mecanismo de acción exacto de las polimixinas aún no está muy claro (29,33).

4.2.3 Mecanismos de resistencia a polimixinas

La resistencia a las polimixinas en bacterias Gram negativas puede ocurrir a través de mutaciones en genes cromosomales que codifican para los TCS PhoP-PhoQ (PhoPQ) y PmrA–PmrB (PmrAB) (5) o mediante transferencia horizontal de genes mediados por plásmidos denominados *plasmid-borne mobile colistin resistance (mcr)*. Estos mecanismos conducen a una modificación en el LPS, disminuyendo la carga negativa neta de sus residuos de fosfato y, en consecuencia, reduciendo la interacción electrostática entre los LPS y las cargas positivas de las polimixinas. En *E. coli* la mutación en el sistema de dos componentes PmrAB se ha identificado como el principal mecanismo asociado con la resistencia a la colistina y la polimixina B (34).

4.2.4 Detección de genes *mcr-1* implicados en la resistencia a polimixinas

El gen *mcr-1* codifica una enzima llamada fosfoetanolamina transferasa que cataliza la adición de fosfoetanolamina (PEA) al lípido A presente en la capa del LPS de los microorganismos Gram negativos, lo que resulta en una disminución de la afinidad de las polimixinas por la membrana externa responsable de la resistencia de las bacterias a este antibiótico (1). El gen *mcr-1* ha sido detectado en colecciones de cepas bacterianas prácticamente en todos los continentes. Aislamientos bacterianos como *E. coli* y *Salmonella* spp., portadoras de dicho gen han sido aisladas de humanos y diversos animales. La gran cantidad de reportes de este gen en animales llevó a la conclusión de que el uso masivo de polimixinas y sus derivados en la crianza animal había llevado a la aparición y diseminación de dicho gen (35). Luego del hallazgo de *mcr-1* en China el gobierno prohibió el uso de colistina (sulfato de colistina) como promotor de crecimiento en la industria avícola y porcina. En el año 2018 el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) prohibió la importación, fabricación,

comercialización y uso de aditivos que contengan polimixina E y B como promotores de crecimiento en especies animales productoras de alimentos para el consumo humano (36). Asimismo, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) inició de inmediato la reevaluación del uso de este fármaco en animales de producción.

A pesar de la rápida propagación de los genes *mcr* en todo el mundo, aún hace falta un consenso de la comunidad científica sobre el impacto clínico de este nuevo mecanismo de resistencia a las polimixinas. Además, la mayoría de los estudios y publicaciones sobre este gen involucran muestras de animales de origen asiático y europeo, y la dinámica de la diseminación de genes *mcr* en América Latina aún no está muy clara (29,33). En una revisión sobre la resistencia a la colistina mediada por plásmidos en América Latina y el Caribe, el país con el mayor número de casos notificados de bacterias *mcr* positivas fue Brasil, con 246 casos (44,7%), seguido de Bolivia con 174 casos (31,6%) Argentina con 101 casos (18,4%), Colombia con 13 casos (2,4%), Perú 7 casos (1,2%), Venezuela 3 casos (0,5%) y Uruguay 2 casos (3,6%). Los países con el menor número de casos fueron Ecuador, Chile, Paraguay y México, con solo un informe cada uno (0,2%) (33).

Según la National Database Antimicrobial Resistant Organismos (NDARO) a mayo 10 de 2021 se han reportado 29 variantes genéticas del gen *mcr-1* en diferentes países (*mcr-1.2*, *mcr-1.3* hasta *mcr-1.30*) tanto en humanos como en animales (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#mcr-1>). Estudios epidemiológicos han sugerido que *mcr-1* se restringe principalmente a no menos de diez especies de *Enterobacterales*.

4.2.5 Plásmidos implicados en la diseminación de genes *mcr-1*

Los plásmidos son moléculas de ADN extra cromosómico generalmente circular que se replican de manera autónoma, se transmiten

independientemente del ADN bacteriano y que pueden portar genes de resistencia a los antimicrobianos(37). Estos plásmidos se pueden dividir en dos grupos principales, el grupo de estrecho rango de hospederos, que con mayor frecuencia pertenece al grupo de incompatibilidad F (IncF), y el grupo de amplio rango de hospederos, que pertenece a IncA /C, IncL/M e IncN (38).Desde la detección inicial de *mcr-1* en el plásmido pHNSHP45 de tipo IncI2 (1), se ha descubierto que más de 10 tipos de plásmidos portan el gen *mcr-1*. Cao et al., encontraron varios plásmidos implicados en la diseminación de genes *mcr-1*: *IncX4*, *IncI2*, *IncP*, *IncX3-IncX4*, *IncFII*, *IncI2-IncFIB*, *IncFI*, *IncX1-IncX2*, *IncHI1* e *IncHI2*(39), siendo los más frecuentes *IncHI2* e *IncI2*, seguidos de *IncX4*. Estos plásmidos portan *mcr-1*, así como otros genes de resistencia, lo que lleva a la transmisión de múltiples determinantes de resistencia a diversos antibióticos.

4.2.6 *Escherichia coli*

A pesar de que *mcr* se ha descrito en una gran variedad de *Enterobacterales*, *E. coli* es el microorganismo que más se reporta portando *mcr-1* a nivel global. Mediante estudios de *Multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE) se estableció que *E. coli* podía clasificarse en cuatro grandes grupos filogenéticos denominados A, B1, B2, D y E, siendo B2 y en menor proporción el D los causantes en gran medida de infección extra intestinal en humanos mientras los grupos A y B1 pertenecían principalmente a comensales (40). En el año 2000, Clermont et al., desarrollaron un método más sencillo para determinar el grupo filogenético, evaluando la presencia o ausencia de los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento de ADN TSPE4.C2. La gran mayoría de las cepas patógenas intestinales pertenecen a los grupos A, B1 y D, mientras que las cepas Extra-intestinales pertenecen principalmente a los grupos B2 y D (41).

E.coli tiene una gran capacidad para adquirir genes de resistencia, especialmente BLEE lo que les confiere resistencia a las cefalosporinas de 3G.

Adicionalmente presenta también co-resistencia a fluoroquinolonas, aminoglucosidos y trimetoprim-sulfametoxazol, limitando las opciones terapéuticas(42). La BLEE que se ha diseminado más frecuentemente en esta especie es CTX-M, y dentro de estas CTX-M-15 asociado a la diseminación clonal del ST131 (43). *E. coli* BLEE es el microorganismo de mayor prevalencia en infecciones de la comunidad y cada vez más frecuentemente asociado a infecciones de origen hospitalario (44), usualmente en instituciones de alta complejidad, con pacientes críticamente enfermos, donde se presentan las mayores complicaciones, altos costos en la atención y mayor mortalidad (45).

En Colombia aislamientos de *E. coli* con CTX-M-15 pertenecientes al ST131 y ST405, clones de alto riesgo fueron reportados por primera vez en 2011(46). Un estudio llevado a cabo por el grupo RAEH de la Universidad El Bosque con *E. coli* causantes de infección urinaria, recolectadas del 2009 al 2017 encontró que el 85% de los aislamientos portaban genes *bla*_{CTX-M-15} y 38% pertenecían al ST131 lo que demuestra una alta circulación de CTX-M-15 y en menor grado del clon ST131 en el país (47).

4.2.7 Clones de alto riesgo

El termino de clon se refiere a una bacteria que se propaga de una única colonia, aislada en un tiempo y lugar específico, implicando que pertenecen al mismo linaje clonal y que derivan de un ancestro común (48). Los clones bacterianos exitosos o de alto riesgo son una fuente importante para la propagación de elementos genéticos móviles que confieren resistencia a los antimicrobianos, es decir, integrones, transposones y plásmidos (49). Estos clones son capaces de proporcionar plataformas estables para el mantenimiento y la propagación de genes responsables de la resistencia a los antimicrobianos y han desempeñado un papel esencial en la aparición mundial de resistencia a múltiples antibióticos entre los organismos Gram negativos, especialmente los *Enterobacterales*(40).

La propagación de clones de alto riesgo genera un mayor problema en términos de salud pública que debe ser monitoreado constantemente. Ortiz de la Tabla et al., (50) reportan un aislamiento de *E. coli* resistente a polimixina con *mcr-1* en un paciente sin enfermedades, ni algún factor de riesgo determinante que no había estado en contacto con animales durante el último año. Este aislado era resistente a β -lactámicos y pertenecía al clon de alto riesgo ST131 mostrando la inserción de *mcr-1* dentro de este clon de alto riesgo. Flament-Simon et al., (51) encontraron una alta variedad de plásmidos, genes de resistencia, mutaciones y genes de virulencia en aislamientos de *E. coli* portadores de *mcr-1* albergados en plásmidos tipo IncX4 e IncHI2. Se sospecha que el plásmido APEC-IncF adquirió el gen *mcr-1* mediante la co-integración de un plásmido IncHI2, lo que demuestra la capacidad que tienen las bacterias para reorganizar fácilmente el ADN por medio de la transferencia horizontal de genes.

4.2.8 Relación entre genes *mcr-1* y otros genes de resistencia

Algunos estudios encontraron que la prevalencia del gen *mcr-1* es más significativa en aislados positivos para BLEE en comparación con no portadores de BLEE (25). No obstante, la identificación de BLEE y carbapenemasas en bacterias que albergan *mcr-1* no se ha hecho en más del 50% de los estudios publicados, y de esta manera es muy difícil establecer un vínculo entre aislamientos positivos o negativos para BLEE y la prevalencia del gen *mcr-1*. Se cree que existe un vínculo histórico entre los genes *mcr-1*, BLEE y carbapenemasas desde la década de 1980; sin embargo, esta evidencia requiere confirmación con más estudios. Es importante tener en cuenta que en estudios realizados de incidencia de *E. coli* productoras de carbapenemasas se han encontrado algunos aislados con genes BLEE y que probablemente también puedan portar genes *mcr-1* (25).

La coexistencia de *mcr-1* y BLEE en *E. coli* se informó por primera vez en china en 2016 (52), y un estudio transversal de prevalencia de genes *mcr-1* y BLEE de aislados de *E. coli* en granjas avícolas de Vietnam también reportó la coexistencia de estos genes generando preocupación por la posible aparición de bacterias MDR e incluso XDR(5), siendo muy probable que los animales de consumo humano se hayan convertido en una de las fuentes más importantes de propagación de estos mecanismos de resistencia a los seres humanos.

4.2.9. Multilocus sequence typing (MLST)

Debido a la gran diseminación de clones exitosos se han desarrollado métodos rápidos para la detección de STs, lo que es útil en los estudios de epidemiología molecular y vigilancia. Entre los métodos más utilizados para la tipificación molecular bacteriana está la electroforesis de campos pulsados (PFGE) y *Multilocus Sequence Typing* (MLST). PFGE es la técnica más utilizada, pero presenta variaciones entre laboratorios, y no cuenta con bases de datos que permita comparaciones globales (53). MLST representa el “*gold estándar*” para los estudios de epidemiología global, basándose en la secuenciación de seis o siete genes altamente conservados, siendo una técnica estandarizada que cuenta con bases de datos, es reproducible y comparable (54).

Existen dos esquemas de MLST, el esquema Achtman que utiliza siete genes housekeeping (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>): *adk* (adenylate kinase), *fumC* (fumarate hydratase), *gyrB* (DNA gyrase), *icd* (isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase), *mdh* (malate dehydrogenase), *purA* (adenylosuccinate dehydrogenase), y *recA* (ATP/GTP binding motif); y el esquema del Instituto Pasteur (http://www.pasteur.fr/recherche/_genopole/PF8/mlst/EColi.html) que utiliza ocho genes: *dinB* (DNA polymerase), *icdA* (isocitrate dehydrogenase), *pabB* (*p*-aminobenzoate synthase), *polB* (polymerase II [Pol II]), *putP* (proline permease), *trpA* (tryptophan synthase subunit A), *trpB* (tryptophan synthase

subunit B), y el *uidA* (beta-glucuronidase). El esquema más utilizado es el esquema de Achtman, el cual ha permitido reconocer la diseminación global de *E. coli* serotipo O25:H4, ST131 perteneciente al grupo filogenético B2 altamente virulento (18).

4.2.10 Métodos para evaluar la susceptibilidad a polimixinas

El uso de las polimixinas en la clínica ha sido algo difícil pues se presentan muchos retos respecto a la toxicidad, a la poca información de la farmacocinética y farmacodinamia, problemas en cuanto a la realización de pruebas de sensibilidad por falta de una estandarización en los puntos de corte clínico. Adicionalmente no se cuenta con una técnica óptima para poder evaluar la susceptibilidad ya que estas son moléculas de gran tamaño y catiónicas, lo que no les permite difundirse adecuadamente en medios a base de agar y se adhieren fácilmente en plásticos con cargas negativas, como las puntas de pipetas, tubos y placas de poliestireno. Por esto la *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) y el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) no recomiendan los métodos de difusión con disco y gradiente debido a que se presentan altos porcentajes de errores mayores y muy mayores. La CLSI junto con EUCAST recomiendan como una opción la microdilución en caldo (BMD), sin surfactante, como método de referencia para determinar la sensibilidad a las polimixinas (55).

En el 2020 la CLSI recomendó el método de elución en caldo con discos de colistina (CBDE) (CLSI M100 2020), siendo una prueba económica, fácil de realizar y confiable. Sin embargo, esta prueba no permite determinar si la resistencia se debe genes *mcr* o a mutaciones cromosómicas (CLSI). Debido a que las enzimas MCR requieren zinc para su actividad, un grupo de investigación modificó la CBDE añadiendo EDTA (EDTA-CBDE). La adición de EDTA al protocolo de CBDE muestra una inhibición del crecimiento en cepas confirmadas como resistentes que albergan *mcr*, y vuelven a la bacteria

sensible. Hay que tener en cuenta que la existencia de múltiples mecanismos de resistencia a la colistina, especialmente aquellos que pueden utilizar la actividad de las metaloenzimas, puede conducir a falsos positivos en los resultados de la prueba EDTA-CBDE. Por lo tanto, esta debe ir acompañada de pruebas moleculares u otro método válido para confirmar la presencia de genes *mcr* (8).

4.3 Marco legal

De acuerdo con la normatividad definida en la Resolución 8430 del Ministerio de Salud de 1993 esta investigación se clasificó como de Riesgo Mínimo ya que es un estudio retrospectivo en el cual se emplea el registro de datos a través de procedimientos comunes como recolección de información de una base de datos y análisis de especímenes microbiológicos. Los aislamientos utilizados fueron obtenidos en un estudio previos durante procedimientos de atención médica autorizadas por los pacientes o sus familiares al momento de ingresar al servicio de atención médica. No se realizó ninguna intervención clínica, ni se obtuvo información clínica relacionada.

5. Diseño metodológico

5.1 Tipo de investigación

Este es un estudio descriptivo retrospectivo para caracterizar fenotípica y molecularmente aislados de *E. coli* resistentes a polimixinas portadores de *mcr-1*.

5.2 Impacto de la investigación

Esta es una investigación de tipo exploratorio que busca identificar la posible diseminación de genes de *mcr-1* asociados a clones de alto riesgo, lo que podría incrementar la resistencia a las polimixinas en un país como Colombia

con altas tasas de resistencia a otros antibióticos. Este tipo de estudios, aunque exploratorios permiten establecer bases para realizar estudios más grandes dependiendo de los resultados obtenidos, y así mismo implementar programas más robustos de vigilancia y control de infecciones para disminuir el impacto de los mismos en el sistema de salud.

5.3 Población y criterios de inclusión

Población: Se seleccionaron del repositorio del RAEH 32 aislamientos de *E. coli* resistentes a polimixinas (CIM ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$) por el método de microdilución en caldo o métodos automatizados enviados al laboratorio del 2017 al 2018. Estos aislamientos hacen parte de estudios de vigilancia de la resistencia antimicrobiana llevados a cabo en hospitales de tercer nivel en 12 ciudades de Colombia, pertenecientes a la RED Hospitalaria para la Contención de la Resistencia Antimicrobiana de la Universidad El Bosque.

Criterios de inclusión:

- Aislamientos clínicos de *E. coli* causantes de infecciones de origen hospitalario y/o de la comunidad con CIM resistente a polimixina.

Criterios de exclusión

- Aislamientos diferentes a la especie *E. coli*
- Aislamientos contaminados

5.4 Técnicas y procedimientos

5.4.1 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

Para la confirmación de la resistencia a polimixinas se realizó la prueba de CBDEM100, 2020 (56). Adicionalmente, y paralela a la anterior se realizó la prueba de CBDE+ EDTA para identificar la posible presencia de genes *mcr* (8). Para la determinación de resistencia a otros grupos de antibióticos se utilizó

microdilucion en caldo utilizando paneles de susceptibilidad (Trek Diagnostic Systems, East Grinstead, West Sussex, UK) siguiendo las indicaciones del fabricante y el método de gradiente (E-test™ BioMerieux, Marcy L'Etoile, France). Como controles de calidad se utilizaron un aislamiento MCR-1 tipificado molecularmente como resistente a polimixina (BioSample: SAMN05806786) y una cepa sensible ATCC™ 25922 *E. coli*.

5.4.1.1 Método de Elución en Caldo con Disco de Colistina (CBDE)

Para esta prueba se utilizaron tubos de vidrio con 10 ml de caldo Mueller-Hinton ajustado con cationes (CAMHB) y discos de colistina de 10 µg (Oxoid, Basingstoke, UK). Se marcaron 4 tubos con CAMHB para cada aislamiento con una concentración de 1, 2 y 4 µg/mL más el control de crecimiento. Se agregó con cuidado 1 disco de colistina en el tubo marcado como "1 µg/mL", 2 discos de colistina en un tubo marcado como "2 µg/mL" y 4 discos de colistina en el tubo marcado como "4 µg/mL". Se agitaron suavemente los tubos con el disco y se dejó que la colistina eluyera de los discos durante más o menos 30 minutos. Se prepararon los inóculos bacterianos al 0,5 en la escala McFarland. Pasado los 30 minutos se añadieron 50 µL del inóculo al control de crecimiento y a los tubos de 1, 2 y 4 µg/mL para lograr una concentración de aproximadamente $7,5 \times 10^5$ UFC/mL y se incubaron a 35°C de 16-20 horas.

Para la lectura se examinó el tubo de control de crecimiento, que debe mostrar una turbidez evidente para que la prueba sea válida, de lo contrario la prueba se tomaría como inválida. Se determinó la CMI reportándose la concentración del último tubo que no presenta una turbidez evidente. Los valores de referencia para *Enterobacterales* y *P. aeruginosa*: ≤ 2 µg/mL = intermedio y ≥ 4 µg/mL = resistente, criterios de la CLSI M100, 2020(56)

5.4.1.2 Método de Elución en Caldo con Disco de Colistina más EDTA (EDTA-CBDE)

Se utilizó la misma metodología descrita anteriormente adicionando un segundo juego de tubos, pero se añadió 20 μ l de EDTA 0,5 M a cada tubo con 10 ml de CAMHB. Se incubaron a 35°C de 16-20 horas. Para la lectura e interpretación, la CMI de colistina se debió reducir a ≤ 1 μ g/ml en presencia de EDTA, lo que concuerda con un resultado positivo de EDTA-CBDE e indica posible resistencia a la colistina mediada por genes *mcr*.

5.4.1.3 Microdilución en Caldo

Se seleccionaron los aislamientos que fueron confirmados como resistentes a colistina por la prueba de CBDE para realizar pruebas de susceptibilidad por microdilución en caldo. Se preparó un inóculo de cada uno de los aislamientos hasta alcanzar una escala de turbidez de 0.5 McFarland. Posteriormente se agregaron 10 μ l del inóculo a un tubo que contenía 11 ml de CAMHB, seguido de esto se agregaron 50 μ l de la suspensión anterior a cada pozo del panel de susceptibilidad (un panel por muestra), los paneles se cubrieron con papel adhesivo y se llevaron a Incubar a 35 ± 2 °C durante 18 a 20 horas.

Para validar el panel de susceptibilidad se debía observar crecimiento en el pozo de control de crecimiento, de lo contrario el panel debía ser considerado inválido. Se determinó la CIM para cada antibiótico y se interpretó según los puntos de corte de la CLSI 2020.

5.4.1.4 Método de Gradiente para ciprofloxacina

Se preparó un inóculo bacteriano equivalente a 0,5 en la escala McFarland. Luego se introdujo un hisopo estéril en el inóculo para que este se impregnara completamente, y se sembró en un agar Mueller-Hinton con un hisopo realizando una siembra masiva en tres direcciones, luego se colocó sobre la superficie del agar una tira de E-test™ para ciprofloxacina (BioMerieux, Marcy L'Etoile, France). Se llevó a incubar a 35 ± 2 °C durante 18 a 20 horas. Para la lectura de este método se observó una zona de inhibición elipsoidal y simétrica, la CIM se leyó donde la elipse corta la tira.

5.4 Identificación molecular de genes *mcr-1*

A los aislamientos confirmados como resistentes a colistina se les realizó PCR convencional para confirmar la presencia de genes *mcr-1*.

Para el procedimiento de la PCR se realizó un *boiling* de cada uno de los aislamientos para lisar la muestra. Para esto se colocó una colonia bacteriana en 50 ul de agua estéril grado molecular y se llevó al termociclador a 98°C por 10 minutos. Se preparó el *master mix* de acuerdo al número de aislamientos a procesar según protocolo estandarizado. En la tabla 1 se relacionan los primers y las condiciones utilizadas para la PCR. El análisis de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Tabla 1. Especificaciones de la PCR convencional para la detección de *mcr-1*.

PCR convencional
<i>mcr-1</i>
Primers
mcr-1 F 5'-AGTCCGTTTGTCTTGTGGC-3'
mcr-1 R 5'-AGATCCTTGGTCTCGGCTTG-3'
Tamaño esperado

320 pb
Controles
Control positivo: cepa MCR-1 <i>E. coli</i>
Control negativo: ATCC 25922 <i>E. coli</i>

Nota: Especificaciones para la identificación del gen *mcr-1* donde se cuenta con un par de primers F (forward) y R (reverse) con una longitud de 20pb cada uno lo cual amplifican en su totalidad el gen que se busca, generando una banda de un tamaño aproximado de 320 pb.

5.4.3 Estudio de clonalidad mediante Electroforesis de Campos Pulsados

Después de haber identificado los aislamientos que dieron positivos para el gen *mcr-1* por PCR, se procedió a realizar la tipificación molecular mediante la técnica de electroforesis de campos pulsados (PFGE) para identificar la relación clonal de los aislamientos. El análisis del gel se realizó utilizando el programa Bionumerics™ (BioMerieux company), utilizando para el análisis el coeficiente de Dice el cual define la similitud en términos de porcentaje. Se consideraron clónales aislamientos que tengan una similitud $\geq 75\%$.

100%: Idénticos

99-85%: Relacionados

86-75%. Posiblemente relacionados

Menos del 75%. No relacionados.

5.4.4 Secuenciación de Genoma Completo

Los aislamientos portadores de *mcr-1* fueron secuenciados por plataforma ilumina. La extracción de ADN genómico se llevó a cabo empleando el kit comercial DNAeasy (QIAGEN) de acuerdo a indicaciones del fabricante y con la adición de pretratamiento de lisis celular establecidos en el laboratorio. Este ADN fue verificado para evaluar su integridad, pureza y concentración por técnicas basadas en espectrofotometría y fluorometría. La preparación de librerías genómicas se realizó por protocolos Illumina con las modificaciones

estandarizadas en el laboratorio. Estas librerías de ADN genómico fueron verificadas y normalizadas empleando los equipos Qubit 2.0 y el bioanalizador Agilent 2000. La secuenciación se realizó en el secuenciador MiSeq para la obtención de lecturas pareadas de 250 bases. Los datos crudos obtenidos de la secuenciación fueron cortados y filtrados de acuerdo a parámetros de calidad y posible contaminación con secuencias del procedimiento. Los ensamblajes de Novo se llevaron a cabo empleando el programa CLC Genomics Workbench 8.1.0.

Es importante aclarar que la secuenciación fue realizada por un grupo de investigación de la universidad El Bosque utilizando la metodología expuesta.

5.4.5 Análisis de bioinformática

Los grupos filogenéticos A, B1, B2, C, D, E y F fueron determinados siguiendo el protocolo publicado por Clermont et al., (57) y confirmándolo por medio de la plataforma in silico (<https://ezclermont.hutton.ac.uk/>). El tipo de secuencia (ST) se determinó siguiendo el esquema de Achtman (MLST 2.0) (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>)(58). Los serotipos O:H (SerotypeFinder 2.0)(59), tipos de plásmidos de incompatibilidad (PlasmidFinder 2.1)(60), genes de virulencia (VirulenceFinder 2.0)(61) y resistoma (Resfinder 4.1) (62), del Center for Genomic Epidemiology (<http://www.genomicepidemiology.org/>)(62), fueron determinados utilizando la herramienta de libre acceso disponible en el Center for Genomic Epidemiology (<http://www.genomicepidemiology.org/>).

La presencia de los diferentes mecanismos de resistencia a ciprofloxacina como la presencia de genes *qnr*, genes que codifican para bombas de expulsión, enzimas acetiladoras (*aac* (6') *lb-cr*) fueron identificados utilizando la herramienta Resfinder 4.1 del Center for Genomic Epidemiology (<http://www.genomicepidemiology.org/>)(62). Adicionalmente, se identificaron las mutaciones en las girasas (*gyrA* – *gyrB*) y topoisomerasas IV (*parC* – *parE*) de los aislamientos secuenciados realizando las anotaciones de los genes con el

programa Patric (<https://www.patricbrc.org/>)(63) y el análisis mediante el alineamiento de secuencias con el programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>). El genoma de Eco K-12 disponible en el GenBank fue utilizado como referencia para el análisis de SGC (GenBank accession number NC000913).

5.4.6 Plan de análisis de datos

El análisis estadístico descriptivo se realizó estableciendo proporciones para las variables cualitativas. Los datos demográficos de los aislamientos fueron organizados en tablas, incluyendo sus perfiles genotípicos de resistencia y susceptibilidad a antibióticos.

6.Resultados

6.1 Confirmación de resistencia a colistina

Los aislamientos seleccionados para este estudio se observan en la tabla 2. Únicamente 7 de los 32 aislados (21.8%) dieron resistentes a colistina con una CIM ≥ 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por la prueba de CBDE. Los aislamientos de *E. coli* confirmados como resistentes a colistinaprovenían de la ciudad de Bogotá (3), uno de Medellín, uno de la ciudad de Pereira, uno de Cali y uno de la ciudad de Ibagué (tabla 2).

A los 7 aislados confirmados como resistentes se les realizó la prueba de CBDE-EDTA donde esperábamos una reducción de la CIM a ≤ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en aquellos aislamientos cuya resistencia a colistina se asociará posiblemente a genes *mcr*. Los resultados de esta prueba no pudieron ser interpretados debido a que los controles no arrojaron los resultados esperados.

Tabla 2. Datos demográficos y resultados de la prueba de CBDE de 32 aislamientos.

ID	Especie	Ciudad	Colistina	Confirmación CBDE
9317	eco	Ibagué	> 4	<1
9491	eco	Bogotá	> 4	<1
9546	eco	Bogotá	> 4	<1
9745	eco	Bogotá	> 4	<1
9764	eco	Bogotá	> 4	<1
9800	eco	Cali	> 4	<1
<u>9824</u>	<u>eco</u>	<u>Cali</u>	<u>4</u>	<u>≥ 8</u>
9831	eco	Bogotá	> 4	<1
9859	eco	Bogotá	> 4	<1
9888	eco	Medellín	> 4	<1
<u>9900</u>	<u>eco</u>	<u>Medellín</u>	<u>≥ 4</u>	<u>≥ 8</u>
<u>9991</u>	<u>eco</u>	<u>Ibagué</u>	<u>> 4</u>	<u>≥ 8</u>
10276	eco	Cúcuta	> 4	<1
<u>10618</u>	<u>eco</u>	<u>Pereira</u>	<u>4</u>	<u>4</u>
10690	eco	Pereira	> 4	<1
10708	eco	Pereira	> 4	<1
10754	eco	Barranquilla	> 4	<1
10873	eco	Barranquilla	> 4	<1
10901	eco	Cúcuta	> 4	<1
10916	eco	Cúcuta	> 4	<1
11133	eco	Neiva	> 4	<1
11136	eco	Neiva	4	<1
11740	eco	Bucaramanga	> 4	<1
11751	eco	Bogotá	> 4	<1
11753	eco	Bogotá	> 4	<1
11800	eco	Bogotá	> 4	<1
11842	eco	Bogotá	> 4	<1
11852	eco	Bogotá	> 4	<1
<u>107</u>	<u>eco</u>	<u>Bogotá</u>	<u>4</u>	<u>≥ 8</u>
<u>109</u>	<u>eco</u>	<u>Bogotá</u>	<u>≥ 4</u>	<u>≥ 8</u>
108	eco	Bogotá	> 4	<1
<u>375</u>	<u>eco</u>	<u>Bogotá</u>	<u>≥ 4</u>	<u>≥ 8</u>

Nota: Datos de resistencia o sensibilidad a colistina de los 32 aislados de *E. coli* por la metodología CBDE aprobada y estandarizada por la CLSI M100 2020, control positivo: cepa MCR-1, control negativo ATCC TM25922 *E. coli*.

6.2 Detección de genes *mcr-1*

La PCR mostró que de los 7 aislamientos resistentes a colistina, 5 albergaban el gen *mcr-1*, correlacionando la resistencia fenotípica a la colistina mostrada

en la CBDE con la mayoría de los aislamientos *mcr-1* positivos con CIMs ≥ 8 ug/ml (figura 1). La resistencia en los dos aislamientos resistentes a colistina, negativos para *mcr-1* se puede deber a variantes diferentes o a modificaciones en el lipopolisacarido, sin embargo, eso no se identificó en este estudio. Es importante tener en cuenta que una limitación de nuestro estudio es que las otras variantes de *mcr* como la *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* entre otras no se evaluaron mediante PCR y la prueba de CBDE-EDTA no pudo ser interpretada.

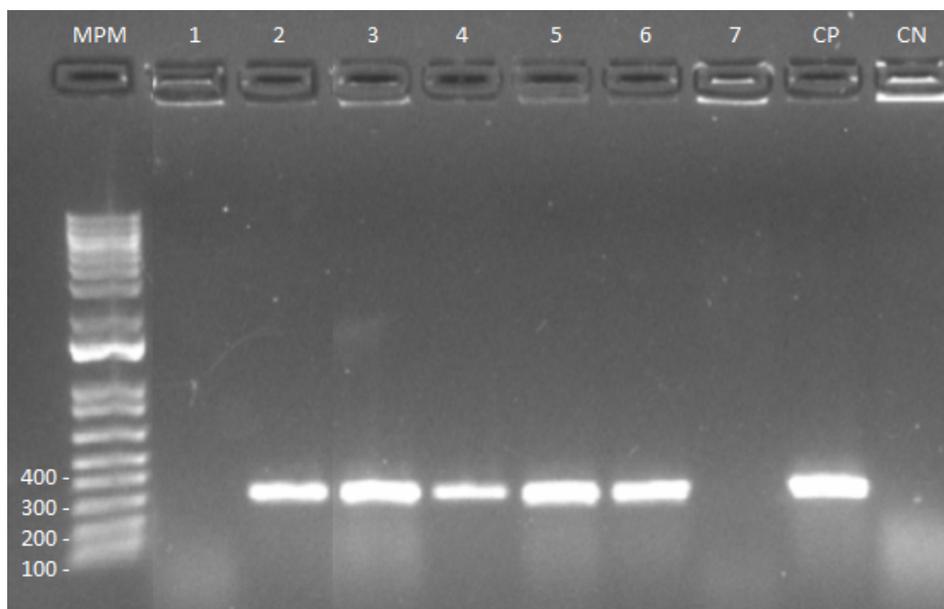


Figura 1. Resultado de la PCR para identificación de genes *mcr-1*: Amplificación por PCR de genes *mcr-1*. MPM: marcador de peso molecular 1 Kb; Carril 1: aislado 9900, Carril 2: aislado 109, Carril 3: aislado 10618, Carril 4: aislado 107, Carril 5: aislado 9991, Carril 6: aislado 9824, Carril 7: aislado 375; CP: control positivo (MCR-1); CN: control negativo (ATCC TM25922 *E. coli*)

6.3 Análisis fenotípico de susceptibilidad antibiótica

Se determinó que el 80% de los aislamientos fueron susceptibles a todos los β -lactámicos, únicamente el aislamiento 9991 presento resistencia a ceftriaxona y cefotaxime y susceptibilidad reducida a ceftazidime. Todos los aislamientos fueron susceptibles a cefepime, piperacilina tazobactam y los

carbapenémicos (tabla 3). Uno de los aislamientos es resistente a fosfomicina (9991) y todos son sensibles a tigeciclina.

Tabla 3. Susceptibilidad a antibióticos de los aislados portadores de *mcr-1* (CIM mg/l)

CEPA	C/T	CZA	CTX	CRO	CAZ	FOS	FOX	FEP	PTZ	ERT	IMI	MER	DOR	CIP	TGC
107	<1/4	<1/4	<0.5	<0.5	<2	<8	<8	<2	<2/4	<0.25	<0.25	<0.25	<0.5	0.50	<0.25
109	<1/4	<1/4	<0.5	<0.5	<2	<8	<8	<2	<2/4	<0.25	<0.25	<0.25	<0.5	>=64	<0.25
10618	<1/4	<1/4	<0.5	<0.5	<2	<8	<8	<2	<2/4	<0.25	<0.25	<0.25	<0.5	0.75	<0.25
9824	<1/4	<1/4	<0.5	<0.5	<2	<8	<8	<2	<2/4	<0.25	<0.25	<0.25	<0.5	0.25	<0.25
9991	<1/4	<1/4	>=8	>=8	4	64	<8	4	<2/4	<0.25	<0.25	<0.25	<0.5	0.094	<0.25

Nota: C/T ceftalozone tazobactam, CZA ceftazidime, CTX cefotaxime, CRO ceftriaxona CAZ ceftazidima, FOS fosfomicina, FOX cefoxitina, FEP cefepima, PTZ piperacilina tazobactam, ERT ertapenem, IMI imipenem, MER meropenem, DOR doripenem, CIP ciprofloxacina, COL colistina, TGC tigeciclina.

6.4 Análisis de clonalidad

Los aislamientos 9824 y 10618 tienen una similitud del 100% lo que los convierte en clonales. Los otros aislamientos no están relacionados entre ellos, a pesar de que el aislamiento 107 y 10618 pertenecen al mismo ST.

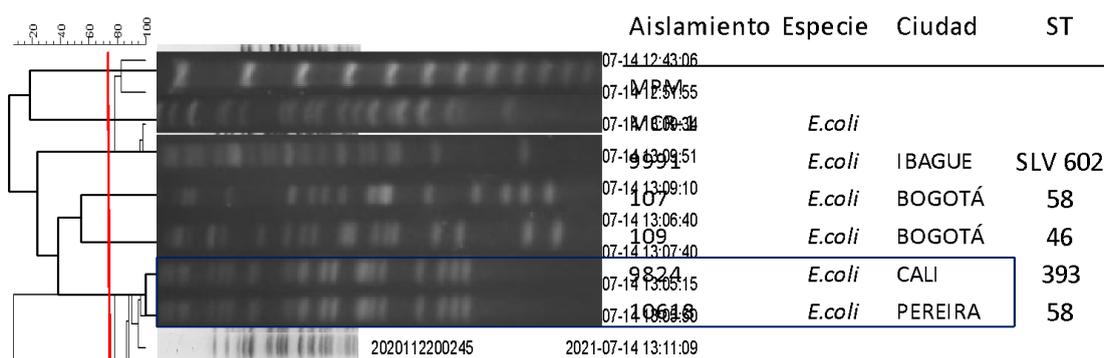


Figura 2 Dendrograma: Aislamientos de *E. coli* portadores de *mcr-1*. Se consideran relacionados aislamientos con un porcentaje de clonalidad superior al 75%.

6.5 Análisis de secuencias de genoma completo

Los genomas de los 5 aislados produjeron de 185 a 307 contigs, con tamaños de ensamblaje que variaron de 4.88 MB a 5.35 MB. Todas las secuencias presentaron buena calidad del genoma lo que permitió realizar los análisis bioinformáticos utilizando la herramienta del Center for Genomic Epidemiology. Se encontró que las cepas pertenecen a serotipos distintos (O9:H17, O9a:H25, H21, O15:H1); también se identificó que estas cepas tienen perfiles alélicos pertenecientes al ST58 (n:2), SLV602, este aislado presentaba un alelo con menos del 100% de identidad y se denomina como un *Single Locus Variant* (SLV) (n:1) y el ST393 (n:1). En el análisis de grupos filogenéticos se encontraron 3 aislamientos del grupo B1 y un aislamiento del D (tabla 4).

Tabla 4. Determinación de grupos filogenéticos y MLST

	Grupo filogenético					Tipo de secuencia MLST
	<i>TspE4</i>	<i>arpA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	<i>GF</i>	
10618	+	+	-	-	B1	58
9991	+	+	-	-	B1	602*
9824	-	+	+	-	D	393
107	+	+	-	-	B1	58
109	-	+	-	-	A	46

Nota: Se presentan los genes para la clasificación del grupo filogenético *arpA*, *chuA*, *yjaA* y el fragmento génico *TspE4.C2*. El grupo filogenético al que pertenece cada cepa se determinó de acuerdo a la clasificación publicada por Clermont et al.,(57). 602* Single locus various (SLV)

6.5.1 Genes de virulencia

Entre los 5 aislamientos secuenciados se encontraron 30 diferentes genes de virulencia, algunos que codifican para adhesinas (*papA*, *papC*, *tsh*), toxinas (*iss*, *hlyF*), genes cápsulares (KPSM II-K52) y genes implicados en la captación de hierro (sideroforos) (*fyuA*, *irp2*, *iucC*, *iutA*, *sitA*, *chuA*). Todos los aislamientos

albergaban los siguientes genes: *iss*, *iucC*, *iutA*, *lpfA*, *ompT*, *sitA*, *terC*, *traT*. Sin embargo, algunos genes fueron variables *cia* (2 aislamientos), *irp2* (2 aislamientos), *fyuA* (3 aislamientos), *cvaC* (3 aislamientos), *tsh* (1 aislamiento) (Tabla 5).

Tabla 5. Genes de virulencia detectados en aislamientos portadores de *mcr-1*

ID	MLST	<i>cia</i>	<i>cvaC</i>	<i>etsC</i>	<i>fyuA</i>	<i>gad</i>	<i>hlyF</i>	<i>irp2</i>	<i>iss</i>	<i>iucC</i>	<i>iutA</i>	<i>lpfA</i>	<i>mchF</i>	<i>ompT</i>	<i>sitA</i>	<i>terC</i>	<i>traT</i>	<i>cea</i>	<i>clb</i>	<i>cma</i>	<i>chuA</i>	<i>eilA</i>	<i>hra</i>	<i>iha</i>	<i>kpsE</i>	<i>kpsMII_K52</i>	<i>mcmA</i>	<i>papA_fsiA_</i>	<i>papC</i>	<i>tsh</i>
10618	58	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
107	58	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
9991	602	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
9824	393	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
109	46	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Nota: Se muestra los diferentes genes presentes en las cepas del estudio en donde el color negro indica la presencia del gen y el color verde ausencia del mismo

6.5.2 Plásmidos de incompatibilidad

Los 14 plásmidos encontrados en estos aislamientos fueron IncFIB, IncFII, IncI1-I, IncX1, IncX4, IncQ1, Col440II, IncFIC, IncI2, Col (pHAD28), IncN, IncFIA, IncHI1A, IncHI1B. Algunos de estos plásmidos han sido descritos portando genes *mcr-1* como IncX4, IncI2 (39).

6.5.3 Resistoma

La variante de *mcr-1* en todos los aislamientos fue 1.1. Estos aislamientos portan genes de resistencia a varios grupos de antibióticos, como β-lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, sulfas, fenicoles y tetraciclinas principalmente. La mayoría de los aislamientos portaban genes tipo TEM-1 que confiere resistencia a penicilinas y únicamente el aislamiento 9991 porta un gen CTX-M-55, BLEE que confiere resistencia a cefalosporinas de tercera

6.5.4 Entorno genético de *mcr-1*

Mediante este análisis se identificó que el aislamiento 107 portaba el gen *mcr-1* en un plásmido tipo Inc1 con una identidad de 99.9% de un plásmido reportado en GenBank con número de acceso CP016187.1. En los otros tres aislamientos la longitud del contig no permitió identificar su localización plasmídica o cromosomal.

7. Discusión

De los 32 aislamientos *E. coli* resistentes en la base de datos del laboratorio únicamente 7 fueron confirmados como tal por el método de CBDE recomendado para el tamizaje de resistencia a colistina por la CLSI M100 2020. Esto demuestra los problemas de los métodos automatizados y microdilución en caldo utilizando paneles plásticos, los cuales pueden sobreestimar la resistencia y la necesidad de confirmar estos resultados por un método de referencia en el laboratorio clínico cuando el aislamiento sea resistente a otros antibióticos y se deba recurrir a las polimixinas como último recurso. También es importante desde el punto de vista epidemiológico descartar la presencia de genes *mcr* por métodos no moleculares, que están más al alcance de los laboratorios de microbiología. Pruebas como la metodología modificada por Bell et al (8) CBDE-EDTA que permite confirmar que el mecanismo por el cual la bacteria está haciendo resistencia a colistina se debe a la presencia de genes *mcr* podrían ser útiles. Sin embargo, los resultados de los controles sensible y resistente en nuestro estudio no permitieron validar la prueba. Esta metodología aún no ha sido validada por la CLSI, sin embargo, Fenwick et al., la utilizó encontrando algunos falsos positivos en aislados de *E. coli* pero obteniendo resultados favorables al utilizar CBDE-EDTA con una sensibilidad del 100% y especificidad del 94,3% con *Enterobacterales* y *P. aeruginosa* pero no recomendándola para *A. baumannii*(64).

En Colombia pocos han sido los estudios acerca de la resistencia a colistina mediada por *mcr*. Después del primer reporte en China en 2015 prácticamente en todo el mundo se inició la búsqueda del gen, debido a la preocupación que causaba al ser este el primer reporte un gen transferible horizontalmente que confería resistencia a polimixinas. En Colombia tenemos datos de tres estudios reportando la presencia de *mcr-1* en aislamientos de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium, *Salmonella enterica* serovar Give, *K.pneumoniae* y *E. coli* de origen humano y provenientes de alimentos crudos(2,65). Sin embargo, el número de aislamientos cuya resistencia se asoció a *mcr* es baja comparado con el mecanismo de modificación en los genes que codifican para el LPS, y se ha reportado más en *E. coli* y *Salmonella entérica* serovar Typhimurium. En este estudio se seleccionó *E. coli* por esa razón tal vez la mayoría de la resistencia confirmada a colistina se debía a la presencia de *mcr-1* más que a modificaciones en la membrana.

En general la resistencia a polimixinas sigue siendo baja en el país, sin embargo, es difícil poder identificar una prevalencia de la misma debido a la falta de puntos de corte que existía antes que no permitía una interpretación adecuada y las dificultades técnicas para su tamizaje con errores mayores y menores. Sin embargo, esos estudios previos muestran aparentemente una baja resistencia, y menor aun debido a la presencia de *mcr-1*, asumiendo que la mayoría de los aislamientos resistentes están más asociados a modificaciones en el lípido A.

Al igual que en nuestro estudio Saavedra et al (2) reportó aislados de *E. coli* portadores de *mcr-1* con la limitante de no detectar otras variantes de este gen, discriminando posiblemente aislados resistentes a colistina, portadores de otras variantes del gen como *mcr-2*, *mcr-3* entre otros. En Latinoamérica el tipo más frecuente de *mcr* ha sido *mcr-1* representando el 99.6% de todos los *mcr*, con escasos reportes de otras variantes como *mcr-3* en muestras clínicas (0.2%) y

mcr-5 en animales (0.2%)(33). En Colombia recientemente se han descrito dos aislamientos clínicos de *Enterobacter cloacae* complex con *mcr-9*(66).

En cuanto al perfil de susceptibilidad la mayoría de los aislamientos muestran susceptibilidad a cefalosporinas de tercera generación. Únicamente uno de los aislamientos mostro resistencia a cefalosporinas de tercera generación, lo que se debió a la presencia de CTX-M-55. A pesar de que estos aislamientos son resistentes a colistina, lo observado muestra que la resistencia a otros grupos de antibióticos es baja, incluyendo β -lactámicos, y quinolinas lo que ofrece alternativas terapéuticas para el tratamiento de infecciones asociadas a este tipo de resistencia. Aun en el aislamiento portador de CTX-M-55 se podría utilizar un carbapenémico como opción terapéutica. A pesar de que no se encontraron aislamientos resistentes a carbapenémicos en nuestro estudio, Saavedra et al (2) reporto un aislamiento resistente a ertapenem, que aunque no portaba una carbapenemasas, tenía una CMY, una cefalosporinasa que cuando se hiper-produce puede elevar la CIM de ertapenem. Esto muestra el potencial que tienen estos aislamientos de llegar a ser resistentes a carbapenémicos. Sin embargo, ninguno de estos aislamientos ni los incluidos en nuestro estudio pertenecen al ST131 ni son portadores de CTX-M-15 considerado un clon de alto riesgo y que ha sido reportado circulando en el país previamente(67)(47).

La diseminación del clon pandémico ST131 relacionado con el gen *mcr-1* ha sido descrita en un estudio en Brasil de muestras de suelo (68), pero hasta el momento no se ha realizado un reporte en Colombia a pesar de ser un país fronterizo, compartiendo diversas actividades agropecuarias.

En el país se han reportado diferentes STs (ST10, ST37, ST101, ST744, ST1263, ST3056 y ST6627) pertenecientes en su mayoría al complejo clonal (CC) 10 y a cuatro grupos filogenéticos (A, B1, C y E) (2). Los ST encontrados en los aislamientos de este estudio no pertenecen a ninguno de estos ST

(ST58, ST 46, ST393 y SLV602), ni al CC10; y pertenecen a los grupos filogenéticos B1 en su mayoría. En otros países se han descrito diferentes STs, ninguno de estos relacionados con los encontrados en este estudio pero sí con lo reportado en Colombia previamente como son los ST 10 y ST101 reportados en el estudio de Wu et al (12). Un estudio a nivel mundial también mostro que la mayoría de aislamientos pertenecían al CC10(69).

La relación identificada en los dos aislados con 100% de identidad, intentan describir la diseminación clonal de *E. coli* a través del país, estos dos aislados eran provenientes de las ciudades de Cali y Pereira, pero pertenecían a diferente STs y grupo filogenético, en el estudio de Saavedra et al describen aislados encontrados en el Valle del Cauca, Bogotá, Antioquia, Caldas, Boyacá y Santander, los 2 aislados encontrados en Antioquia pertenecían al ST 101, fueron clónales y compartían el mismo grupo filogenético (2).

8. Conclusiones

- La resistencia a polimixinas sigue siendo baja en el país, sin embargo, es difícil determinar el porcentaje de resistencia utilizando los reportes de vigilancia debido a los problemas para determinar la susceptibilidad por métodos automatizados de microdilución en caldo.
- La CBDE permitió discriminar de una manera más efectiva los aislamientos resistentes a colistina, mostrando así las falsas resistencias que se identificaron en los reportes de vigilancia donde se clasificaba la totalidad de aislados estudiados (n:32) como resistentes a colistina y siendo finalmente solo 7 realmente resistente.
- En general los aislamientos no presentan alta resistencia a otros antibióticos, incluyendo β -lactámicos, solo uno mostró un fenotipo de BLEE en microdilución en caldo y confirmado con SGC una CTX-M 55, dos aislados presentaron resistencia a ciprofloxacina identificada en la

metodología E-test y confirmada con la identificación de mutaciones en la SGC, esto deja buenas opciones terapéuticas al momento de tratar infecciones por estos microorganismos portadores de *mcr-1* aun así presenten fenotipos tipo BLEE.

- La PCR para la detección del gen *mcr-1* permitió identificar que los 5 aislados obtenían resistencia a la colistina por la presencia de este gen en particular y no por los otros mecanismos como mutaciones de membrana mencionados anteriormente.
- Se detectaron pocos genes de resistencia y no se halló coexistencia con *mcr-1*, aun así, no se detectaron aislamientos positivos para los genes *blaKPC*, *blaNDM*, *blaIMP*, *blaOXA-48*, *blaVIM* y uno solo con *CTX-M 55* relacionando este hallazgo con lo reportado en otros países.
- La PFGE permitió identificar la clonalidad de dos aislamientos de diferentes zonas del país, esto explica una posible relación entre estos dos aislados. En el análisis in silico presentaron diferentes STs y grupos filogenéticos, sin embargo, la identidad clonal de estos dos aislamientos no descarta la posible cercanía local a pesar de sus diferencias filogenéticas
- Se encontró una gran variabilidad de plásmidos de incompatibilidad y genes de virulencia, en donde los de mayor predominio fueron *IncFII* y *IncFIIB* lo que permite inferir que son responsables de la diseminación de genes de resistencia de tipo *CTX-M* y posiblemente *mcr*.
- Aunque actualmente no se recomienda el uso de polimixinas excepto en microorganismo panresistentes, la inserción de plásmidos portadores de *mcr* en clones exitosos como el ST131, ST405 y ST628 aún no se ha encontrado sin embargo su posterior reporte podría generar una emergencia de resistencia en el futuro.

- Las características moleculares y genéticas de resistencia de los aislamientos de *E. coli* permitieron observar que los aislados portadores de genes *mcr* aun presentan pocos determinantes genéticos de resistencia que los harían alarmantes en el momento del hallazgo clínico de estos microorganismos.

Recomendaciones

Este estudio podría realizarse con un mayor número de muestras donde la investigación sea representativa y permita evaluar de manera más amplia el estado de diseminación de genes *mcr-1* a nivel nacional, sus características moleculares, entornos genéticos, relaciones clónales y con otros genes de resistencia, que determinen la importancia de detectar a tiempo la resistencia a colistina mediada por este tipo de genes que se diseminan a través de plásmidos y que podrían llegar a ser un problema mayor en algunos años.

En cuanto al tema principal del estudio que es la resistencia bacteriana y que es un problema mundial que nos compete a todos, es fundamental que se siga con la creación de programas que tengan como objetivo la vigilancia y el control arduo y además de esto lanzar alternativas de prevención y tratamiento que puedan ayudar a contrarrestar los efectos que causa el uso y abuso desmedido de antibióticos. de este modo fomentar y apoyar las investigaciones encaminadas a este tema que contribuirán con el fortalecimiento de los sistemas sanitarios públicos y a la posible creación de nuevos antibióticos especialmente para tratar bacterias MDR.

Socializaciones

Este estudio se presentó en el grupo de investigación REMA de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca como webinar de resistencia bacteriana.

Este estudio se publicará como artículo de investigación en una revista indexada

9. Referencias bibliográficas

1. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2020 Sep 28];16(2):161–8. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S1473309915004247/fulltext>
2. Saavedra SY, Diaz L, Wiesner M, Correa A, Alejandra Arévalo S, Reyes J, et al. Genomic and molecular characterization of clinical isolates of Enterobacteriaceae harboring mcr-1 in Colombia, 2002 to 2016. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2020 Sep 28];61(12). Available from: <http://aac.asm.org/>
3. Velasco JMS, Valderama MTG, Margulieux KR, Diones PCS, Reyes AMB, Leonardia SG, et al. First report of the mcr-1 colistin resistance gene identified in two *Escherichia coli* isolates from clinical samples, Philippines, 2018. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020 Jun 1;21:291–3.
4. Amin MB, Sraboni AS, Hossain MI, Roy S, Mozmader TAU, Unicomb L, et al. Occurrence and genetic characteristics of mcr-1-positive colistin-resistant *E. coli* from poultry environments in Bangladesh. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020 Sep 1;22:546–52.
5. Vounba P, Rhouma M, Arsenault J, Bada Alambédji R, Fravallo P, Fairbrother JM. Prevalence of colistin resistance and mcr-1/mcr-2 genes in extended-spectrum β -lactamase/AmpC-producing *Escherichia coli* isolated from chickens in Canada, Senegal and Vietnam. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019 Dec 1;19:222–7.
6. Zhang H, Srinivas S, Xu Y, Wei W, Feng Y. Genetic and Biochemical Mechanisms for Bacterial Lipid A Modifiers Associated with Polymyxin Resistance [Internet]. Vol. 44, *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier Ltd; 2019 [cited 2020 Sep 28]. p. 973–88. Available from: <http://www.cell.com/article/S0968000419301355/fulltext>
7. Ezadi F, Ardebili A, Mirnejad R. Antimicrobial susceptibility testing for polymyxins: Challenges, issues, and recommendations [Internet]. Vol. 57, *Journal of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology; 2018 [cited 2020 Sep 28]. Available from: <https://jcm.asm.org/content/57/4/e01390-18>
8. Bell DT, Bergman Y, Kazmi AQ, Lewis S, Tamma PD, Simner PJ. A novel phenotypic method to screen for plasmid-mediated colistin resistance among enterobacteriales. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2020 Sep 28];57(5). Available from: <https://doi.org/10.1128/JCM.00040-19>.
9. Lerminiaux NA, Cameron ADS. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Can J Microbiol* [Internet]. 2019 Jan [cited 2020 Sep 28];65(1):34–44. Available from:

- <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/cjm-2018-0275>
10. Tarabai H, Valcek A, Jamborova I, Vazhov S V., Karyakin I V., Raab R, et al. Plasmid-mediated *mcr-1* colistin resistance in *Escherichia coli* from a black kite in Russia. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2020 Sep 28];63(9). Available from: <https://doi.org/10.1128/AAC>
 11. Nang SC, Li J, Velkov T. The rise and spread of *mcr* plasmid-mediated polymyxin resistance [Internet]. Vol. 45, *Critical Reviews in Microbiology*. Taylor and Francis Ltd; 2019 [cited 2020 Sep 28]. p. 131–61. Available from: </pmc/articles/PMC6625916/?report=abstract>
 12. Wu C, Wang Y, Shi X, Wang S, Ren H, Shen Z, et al. Rapid rise of the ESBL and *mcr-1* genes in *Escherichia coli* of chicken origin in China, 2008–2014. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2020 Sep 28];7(1):1–10. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1038/s41426-018-0033-1>
 13. Jeannot K, Bolard A, Plésiat P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *Int J Antimicrob Agents*. 2017 May 1;49(5):526–35.
 14. Liu YY, Chandler CE, Leung LM, McElheny CL, Mettus RT, Shanks RMQ, et al. Structural modification of lipopolysaccharide conferred by *mcr-1* in gram-negative ESKAPE pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2020 Sep 28];61(6). Available from: <http://aac.asm.org/>
 15. Luo Q, Yu W, Zhou K, Guo L, Shen P, Lu H, et al. Molecular Epidemiology and Colistin Resistant Mechanism of *mcr*-Positive and *mcr*-Negative Clinical Isolated *Escherichia coli*. *Front Microbiol* [Internet]. 2017 Nov 17 [cited 2020 Sep 28];8(NOV):2262. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.02262/full>
 16. Doumith M, Godbole G, Ashton P, Larkin L, Dallman T, Day M, et al. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene conferring colistin resistance in human and food isolates of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in England and Wales. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2020 Sep 28];71(8):2300–5. Available from: <https://academic.oup.com/jac/article/71/8/2300/2237830>
 17. Gao R, Hu Y, Li Z, Sun J, Wang Q, Lin J, et al. Dissemination and Mechanism for the MCR-1 Colistin Resistance. Zhang G, editor. *PLOS Pathog* [Internet]. 2016 Nov 28 [cited 2020 Sep 28];12(11):e1005957. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1005957>
 18. Wang Q, Li Z, Lin J, Wang X, Deng X, Feng Y. Complex dissemination of the diversified *mcr-1*-harbouring plasmids in *Escherichia coli* of different sequence types. *Oncotarget* [Internet]. 2016 Oct 12 [cited 2020 Sep 28];7(50):82112–22. Available from: www.impactjournals.com/oncotarget/
 19. OPS. OMS. Alerta Epidemiológica; Enterobacterias con resistencia transferible a colistina, Implicaciones para la salud publica en las Américas [Internet]. 2016 [cited 2020

- Sep 28]. Available from: www.paho.org
20. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections [Internet]. Vol. 40, *Clinical Infectious Diseases*. Oxford Academic; 2005 [cited 2020 Sep 28]. p. 1333–41. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/429323>
 21. Doi Y. Treatment Options for Carbapenem-resistant Gram-negative Bacterial Infections. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2019 Nov 13 [cited 2020 Sep 28];69(S7):S565–75. Available from: https://academic.oup.com/cid/article/69/Supplement_7/S565/5623998
 22. WHO. WHO | Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. WHO [Internet]. 2017 [cited 2020 Sep 28]; Available from: <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>
 23. Salud IN de. INFORME DE RESULTADOS DE LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN INFECCIONES ASOCIADAS A LA ATENCIÓN EN SALUD [Internet]. 2018 [cited 2020 Nov 3]. Available from: [https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informacin de laboratorio/Informe-vigilancia-por-laboratorio-resistencia-antimicrobiana-y-whonet-IAAS-2018.pdf](https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informacin%20de%20laboratorio/Informe-vigilancia-por-laboratorio-resistencia-antimicrobiana-y-whonet-IAAS-2018.pdf)
 24. OMS. Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. 2020 [cited 2020 Oct 1]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos>
 25. Rhouma M, Letellier A. Extended-spectrum β -lactamases, carbapenemases and the mcr-1 gene: is there a historical link? Vol. 49, *International Journal of Antimicrobial Agents*. Elsevier B.V.; 2017. p. 269–71.
 26. OPS O. OPS/OMS | Países de las Américas deben actuar ahora para proteger a las personas de las bacterias resistentes a los antibióticos [Internet]. [cited 2020 Oct 1]. Available from: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9512:2014-countries-americas-share-risk-antibiotic-resistance-must-act-now-protect-health&Itemid=1926&lang=es
 27. Grundmann H, Glasner C, Albiger B, Aanensen DM, Tomlinson CT, Andrasević AT, et al. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2020 Nov 3];17(2):153–63. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S1473309916302572/fulltext>
 28. Karaiskos I, Lagou S, Pontikis K, Rapti V, Poulakou G. The “Old” and the “New”

- antibiotics for MDR Gram-negative pathogens: For whom, when, and how. Vol. 7, *Frontiers in Public Health*. Frontiers Media S.A.; 2019. p. 151.
29. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes [Internet]. Vol. 30, *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology; 2017 [cited 2020 Sep 29]. p. 557–96. Available from: <http://cmr.asm.org/>
 30. Molina J, Cordero E, Palomino J, Pachón J. Aminoglycosides and polymyxins. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2009 Mar 1 [cited 2020 Sep 29];27(3):178–88. Available from: <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-aminoglucosidos-polimixinas-S0213005X09000986>
 31. Bush K, Bradford PA. β -lactams and β -lactamase inhibitors: An overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2020 Oct 21];6(8). Available from: [/pmc/articles/PMC4968164/?report=abstract](https://pmc/articles/PMC4968164/?report=abstract)
 32. Catry B, Cavaleri M, Baptiste K, Grave K, Grein K, Holm A, et al. Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. Vol. 46, *International Journal of Antimicrobial Agents*. Elsevier B.V.; 2015. p. 297–306.
 33. Mendes Oliveira VR, Paiva MC, Lima WG. Plasmid-mediated colistin resistance in Latin America and Caribbean: A systematic review. Vol. 31, *Travel Medicine and Infectious Disease*. Elsevier USA; 2019. p. 101459.
 34. Tiwari S, Jamal SB, Hassan SS, Carvalho PVSD, Almeida S, Barh D, et al. Two-Component Signal Transduction Systems of Pathogenic Bacteria As Targets for Antimicrobial Therapy: An Overview. *Front Microbiol* [Internet]. 2017 Oct 10 [cited 2020 Sep 28];8(OCT):1878. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01878/full>
 35. Kempf I, Fleury MA, Drider D, Bruneau M, Sanders P, Chauvin C, et al. What do we know about resistance to colistin in Enterobacteriaceae in avian and pig production in Europe? Vol. 42, *International Journal of Antimicrobial Agents*. Elsevier; 2013. p. 379–83.
 36. Instituto Colombiano Agropecuario ICA. Resolucion No 00022747 [Internet]. 2018 [cited 2020 Sep 28]. Available from: <https://www.ica.gov.co/getattachment/4972ba67-e1ba-4b2a-89ed-09f54f5c62b4/2018R22747.aspx>
 37. Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. Vol. 303, *International Journal of Medical Microbiology*. Urban & Fischer; 2013. p. 298–304.
 38. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids

- by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods*. 2005 Dec 1;63(3):219–28.
39. Cao L, Li X, Xu Y, Shen J. Prevalence and molecular characteristics of *mcr-1* colistin resistance in *Escherichia coli*: isolates of clinical infection from a Chinese University Hospital. *Infect Drug Resist* [Internet]. 2018 Sep 26 [cited 2020 Sep 28];Volume 11:1597–603. Available from: <https://www.dovepress.com/prevalence-and-molecular-characteristics-of-mcr-1-colistin-resistance--peer-reviewed-article-IDR>
 40. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JDD. The role of epidemic resistance plasmids and international high- risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2020 Sep 28];28(3):565–91. Available from: <http://cmr.asm.org/>
 41. Chaudhuri RR, Henderson IR. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny [Internet]. Vol. 12, Infection, Genetics and Evolution. *Infect Genet Evol*; 2012 [cited 2020 Oct 21]. p. 214–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22266241/>
 42. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Infect Control*. 2006 Jun 1;34(5 SUPPL.):S20–8.
 43. Nicolas-Chanoine MH, Bertrand X, Madec JY. *Escherichia coli* st131, an intriguing clonal group. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2014 Jul 1 [cited 2020 Sep 28];27(3):543–74. Available from: <http://cmr.asm.org/>
 44. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli* [Internet]. Vol. 2, Nature Reviews Microbiology. Nature Publishing Group; 2004 [cited 2020 Oct 21]. p. 123–40. Available from: www.nature.com/reviews/micro
 45. Friedman ND, Temkin E, Carmeli Y. The negative impact of antibiotic resistance [Internet]. Vol. 22, Clinical Microbiology and Infection. Elsevier B.V.; 2016 [cited 2020 Oct 21]. p. 416–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26706614/>
 46. Ruiz SJ, Montealegre MC, Ruiz-Garbajosa P, Correa A, Briceño DF, Martínez E, et al. First characterization of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST131 and ST405 clones causing community-onset infections in South America. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2011 May [cited 2020 Nov 3];49(5):1993–6. Available from: [/pmc/articles/PMC3122632/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21111111/)
 47. Cadena ED La, Mojica MF, Castillo N, Correa A, Appel TM, García-Betancur JC, et al. Genomic analysis of *ctx-m*-group-1-producing extraintestinal pathogenic *E. coli* (exPEC) from patients with urinary tract infections (UTI) from Colombia. *Antibiotics* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2021 Jun 7];9(12):1–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33322118/>
 48. Dijkshoorn L, Ursing BM, Ursing JB. Strain, clone and species: Comments on three basic concepts of bacteriology [Internet]. Vol. 49, Journal of Medical Microbiology. Lippincott Williams and Wilkins; 2000 [cited 2020 Nov 3]. p. 397–401. Available from:

- <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/0022-1317-49-5-397>
49. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: The role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance [Internet]. Vol. 35, FEMS Microbiology Reviews. Oxford Academic; 2011 [cited 2020 Nov 3]. p. 736–55. Available from: <https://academic.oup.com/femsre/article/35/5/736/2680367>
 50. Ortiz de la Tabla V, Ortega A, Buñuel F, Pérez-Vázquez M, Marcos B, Oteo J. Detection of the high-risk clone ST131 of *Escherichia coli* carrying the colistin resistance gene *mcr-1* and causing acute peritonitis. Vol. 49, International Journal of Antimicrobial Agents. Elsevier B.V.; 2017. p. 115–6.
 51. Flament-Simon SC, de Toro M, Mora A, García V, García-Meniño I, Díaz-Jiménez D, et al. Whole Genome Sequencing and Characteristics of *mcr-1*–Harboring Plasmids of Porcine *Escherichia coli* Isolates Belonging to the High-Risk Clone O25b:H4-ST131 Clade B. *Front Microbiol.* 2020 Mar 24;11:387.
 52. Bi Z, Berglund B, Sun Q, Nilsson M, Chen B, Tärnberg M, et al. Prevalence of the *mcr-1* colistin resistance gene in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from human faecal samples collected in 2012 in rural villages in Shandong Province, China. *Int J Antimicrob Agents.* 2017 Apr 1;49(4):493–7.
 53. Petty NK, Zakour NLB, Stanton-Cook M, Skippington E, Totsika M, Forde BM, et al. Global dissemination of a multidrug resistant *Escherichia coli* clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2014 Apr 15 [cited 2020 Oct 3];111(15):5694–9. Available from: </pmc/articles/PMC3992628/?report=abstract>
 54. Peirano G, Bradford PA, Kazmierczak KM, Badal RE, Hackel M, Hoban DJ, et al. Global Incidence of Carbapenemase-Producing *Escherichia Coli* ST131. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2014 Nov 1 [cited 2020 Oct 2];20(11):1928–31. Available from: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/20/11/14-1388_article
 55. Simner PJ, Bergman Y, Trejo M, Roberts AA, Marayan R, Tekle T, et al. Two-site evaluation of the colistin broth disk elution test to determine colistin in vitro activity against Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2020 Sep 28];57(2). Available from: <https://doi.org/10.1128/JCM>
 56. Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI [Internet]. [cited 2020 Nov 3]. Available from: <https://clsi.org/standards/products/free-resources/access-our-free-resources/>
 57. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2000 [cited 2021 Aug 22];66(10):4555. Available from: </pmc/articles/PMC92342/>
 58. Larsen M V., Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol.* 2012 Apr;50(4):1355–61.
 59. Joensen KG, Tetzschner AMM, Iguchi A, Aarestrup FM, Scheutz F. Rapid and easy in

- silico serotyping of *Escherichia coli* isolates by use of whole-genome sequencing data. *J Clin Microbiol*. 2015 Aug 1;53(8):2410–26.
60. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Larsen MV, Lund O, Villa L, et al. In Silico Detection and Typing of Plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing. 2014 [cited 2021 Aug 31]; Available from: <http://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>
 61. Tetzschner AMM, Johnson JR, Johnston BD, Lund O, Scheutz F. In Silico genotyping of *Escherichia coli* isolates for extraintestinal virulence genes by use of whole-genome sequencing data. *J Clin Microbiol*. 2020 Oct 1;58(10).
 62. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2021 Aug 31];75(12):3491. Available from: [/pmc/articles/PMC7662176/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34910000/)
 63. Brettin T, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Olsen GJ, et al. RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Sci Rep* [Internet]. 2015 Feb 10 [cited 2021 Aug 31];5. Available from: [/pmc/articles/PMC4322359/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25919739/)
 64. Fenwick AJ, Bergman Y, Lewis S, Yee R, Uhlemann A-C, Cole N, et al. Evaluation of the NG-Test MCR-1 Lateral Flow Assay and EDTA-Colistin Broth Disk Elution Methods To Detect Plasmid-Mediated Colistin Resistance among Gram-Negative Bacterial Isolates. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2020 [cited 2021 Aug 22];58(4). Available from: [/pmc/articles/PMC7098752/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33710000/)
 65. INVIMA. ALERTA SANITARIA OFICINA DE LABORATORIOS Y CONTROL DE CALIDAD-LABORATORIO MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS. [cited 2021 Aug 22]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099>
 66. Rada AM, de la Cadena E, Agudelo C, Capataz C, Orozco N, Pallares C, et al. Dynamics of blaKPC-2 Dissemination from Non-CG258 *Klebsiella pneumoniae* to Other Enterobacterales via IncN Plasmids in an Area of High Endemicity. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2021 Aug 31];64(12). Available from: <https://journals.asm.org/journal/aac>
 67. Ruiz SJ, Montealegre MC, Ruiz-Garbajosa P, Correa A, Briceño DF, Martínez E, et al. First characterization of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST131 and ST405 clones causing community-onset infections in South America. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2011 May [cited 2021 Sep 1];49(5):1993–6. Available from: <https://journals.asm.org/journal/jcm>
 68. Lopes R, Furlan JPR, dos Santos LDR, Gallo IFL, Stehling EG. Colistin-Resistant mcr-1-Positive *Escherichia coli* ST131-H22 Carrying blaCTX-M-15 and qnrB19 in Agricultural Soil. *Front Microbiol*. 2021 Apr 9;0:753.
 69. MG W, MA E, DF S, GG S, KM K. Prevalence of mcr-type genes among colistin-resistant

Enterobacteriaceae collected in 2014-2016 as part of the INFORM global surveillance program. PLoS One [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2021 Sep 1];13(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29608599/>