

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA FACULTAD DE  
CIENCIAS VETERINARIAS**

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de  
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

“Determinación de Perfiles de Resistencia a los  
Antimicrobianos de Importancia Crítica en Cepas de  
*Escherichia coli* y *Enterococcus* spp. aislados de  
Pinzones Terrestres (*Geospiza* spp.) de la Isla Santa  
Cruz en Galápagos”

**AUTOR: MVZ. MSc. Baquero María Inés**

**DIRECTOR: Dra. Giacoboni Gabriela**

**CODIRECTOR: Dr. Vinueza Christian**

Lugares de realización:

**Laboratorio de la Agencia para la Bioseguridad y Cuarentena para  
Galápagos (ABG)**

**Laboratorio de Bacteriología y Micología FMVZ-UCE**

**Laboratorio de Enfermedades Transmitidas por Alimentos y Resistencia a  
los Antimicrobianos (UNIETAR) de la, FMVZ-UCE**

Miembros del Jurado

**Dra. María Belén Cevallos**

**Dra. Julia Inés Díaz**

**Dra. Nora Mestorino**

**2023**

## DEDICATORIA

*A Dios, por todo.*

*A mi hijo Oscar Eduardo (mi bebé) y a mi esposo Oscar,  
por su amor incondicional; son mi vida, los amo.*

*A mis padres (Margarita y Gonzalo) por sus enseñanzas,  
amor y paciencia.*

*A mis hermanas (Margarita y Belén) y familia (Pancho,  
Vicky, Any, Juan Pe, Tata), por ser mi apoyo  
incondicional.*

*A Grecita y Rosita por ser mi segunda familia, gracias por  
todo.*

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Central del Ecuador.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Central del Ecuador.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

A la Dra. Gabriela Giacoboni, por ser mi tutora y guía durante todo este proceso. Gracias por los consejos y enseñanzas compartidas. Realmente ha sido un honor que haya aceptado la dirección de este trabajo.

Al Dr. Christian Vinuesa por aceptar ser mi Codirector; gracias por la ayuda brindada en esta investigación y por abrirme las puertas de su laboratorio; sin ese soporte, este estudio no habría sido posible.

A la Dra. Marilyn Cruz, Alberto Vélez, Viviana Duque, Paulina Castillo, Alejandro Vega y todo el equipo de la ABG, por prestar su apoyo incondicional en la logística del trabajo en las Islas Galápagos. Su ayuda fue muy importante para alcanzar los objetivos de la tesis. Gracias por la buena predisposición, amabilidad y amistad brindadas. No podría dejar de mencionar a Vanessa López quien fue un pilar importante en el muestreo, eres una excelente profesional.

Al Parque Nacional Galápagos por su apertura y buena predisposición en brindar los permisos y el apoyo para la realización de esta investigación.

A todo el equipo del Laboratorio de Bacteriología y de la UNIETAR de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Central del Ecuador; gracias por el total apoyo en este trabajo y siempre. Valoro mucho el sacrificio que realizaron durante la pandemia para que esta investigación no frenará. Gracias a la Dra. María Belén Cevallos, Carlos Gómez, José Luis Medina, Sofia de Janon y Don Jorgito Vásquez.

A Dr. Fernando Villavicencio y Wladimir Enríquez del Instituto Nacional de Salud Pública (INSPI) por su buena predisposición y apoyo en la realización de la técnica de Campo Pulsado. Gracias por la paciencia y las enseñanzas compartidas.

A Clara López por su buena disposición y colaboración en el análisis estadístico. Estoy muy agradecida por el tiempo dedicado a esta tesis.

A la Dra. Paula Gagetti del Instituto Malbrán por su ayuda en la revisión de los análisis de PFGE. Muchas gracias por el tiempo dedicado.

## **CITAS BIBLIOGRÁFICAS DE PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS**

López VF, Baquero MI, Cruz M, Duque VM, Vélez EA, Vinueza CH, Giacoboni GI. Resistencia a los antimicrobianos en aislados de *Escherichia coli* y *Enterobacter* spp. aislados de pinzones terrestres de la Isla Santa Cruz. I Congreso Internacional de Resistencia a los Antimicrobianos con enfoque One Health. Resumen Rev Ecuador es Calidad 2020; <https://doi.org/10.36331/revista.v7i1.86>

Racines, D, Baquero MI, Cruz M, Duque VM, Vélez EA, Vinueza CH, Giacoboni GI. Perfil fenotípico de resistencia a antimicrobianos de *Enterococcus* spp. aislados de pinzones de Galápagos, Ecuador. I Congreso Internacional de Resistencia a los Antimicrobianos con enfoque One Health. Resumen Rev Ecuador es Calidad 2020; <https://doi.org/10.36331/revista.v7i1.92>

Baquero MI, López VF, Cruz M, Duque VM; Vélez EA, Vinueza CV, Giacoboni, GI. Antibiotic Resistance Profile in *Enterobacter* spp. isolates from Darwin Finches (*Geospiza* spp.) in Santa Cruz on the Galapagos Islands. Tenth International Conference on Antimicrobial Agents in Veterinary Medicine (AAVM) 2020. Póster, DOI:10.13140/RG.2.2.24431.66721

Baquero MI, López VF, Cruz M, Duque VM; Vélez EA, Vinueza CV, Giacoboni, GI. Perfil fenotípico de resistencia a los antimicrobianos en pinzones terrestres de tres zonas de la isla Santa Cruz en Galápagos. I Congreso de Microbiología Veterinaria, La Plata, Argentina, 2021, Resumen: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/122453>.

Baquero MI, Cruz M, Duque VM; Vélez EA, López VF, Vinuesa CV, Giacoboni, GI. Identificación de genes productores de BLEE en *E. coli* y *Enterobacter* spp. aislados de pinzones de Galápagos. First International Symposium On One Health, One Planet and Ii Encontro Nacional De Saúde Única, del 03 a 05 de noviembre de 202

## ÍNDICE

CÁRATULA.....	I
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
CITAS BIBLIOGRÁFICAS DE PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS .....	V
INDICE DE TABLAS .....	XIV
INDICE DE FIGURAS .....	XV
ABREVIATURAS Y SIMBOLOS .....	XVIII
RESUMEN .....	XXIII
ABSTRACT .....	XXV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Resistencia a los antimicrobianos (RAM).....	1
1.1.1. Importancia de la resistencia a los antimicrobianos .....	3
1.1.2. Clasificación de los antimicrobianos de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud.....	3
1.1.3. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos .....	5
1.1.4. Resistencia a los betalactámicos .....	7
1.1.5. Resistencia a la colistina .....	9
1.1.6. Resistencia a la vancomicina .....	10
1.1.7. Resistencia a la tetraciclina.....	11
1.2. Bacterias centinela para la determinación de la RAM.....	13

1.2.1.	<i>Escherichia coli</i> .....	13
1.2.2.	<i>Enterococcus</i> spp. ....	13
1.3.	Resistencia a los antimicrobianos en fauna silvestre .....	15
1.3.1.	Resistencia a los antimicrobianos en aves silvestres .....	16
1.3.2.	Resistencia a los antimicrobianos en aves paseriformes .....	17
1.4.	Las Islas Galápagos.....	19
1.4.1.	Archipiélago de Galápagos.....	19
1.4.2.	Pinzones de Darwin .....	20
1.4.3.	Resistencia a los antimicrobianos en las Islas Galápagos.....	22
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	25
2.1.	Hipótesis.....	25
2.2.	Objetivo general .....	26
2.3.	Objetivos específicos .....	26
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
3.1.	Muestreo y transporte de muestras.....	27
3.2.	Aislamiento e identificación de cepas centinela en pinzones de Darwin ( <i>Geospiza</i> spp.).....	30
3.2.1.	Aislamiento de <i>Escherichia coli</i> .....	30
3.2.2.	Identificación bioquímica de <i>Escherichia coli</i> .....	31
3.2.3.	Aislamiento de <i>Enterococcus</i> spp.....	31
3.2.4.	Identificación bioquímica de <i>Enterococcus</i> spp. ....	32
3.2.5.	Conservación de cepas aisladas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Enterococcus</i> spp.....	34
3.2.6.	Determinación fenotípica de perfiles de resistencia a los	

antimicrobianos en cepas Centinela en pinzones de Darwin ( <i>Geospiza</i> spp.) por el método de difusión en disco (Kirby Bauer) .....	34
3.2.7. Determinación fenotípica de perfiles de resistencia a los antimicrobianos en cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	35
3.2.8. Determinación fenotípica de perfiles de resistencia a los antimicrobianos en cepas de <i>Enterococcus</i> spp. ....	35
3.3. Determinación genotípica de perfiles de resistencia a los antimicrobianos en cepas centinela en pinzones de Darwin ( <i>Geospiza</i> spp.) .....	36
3.3.1. Extracción de ácidos nucleicos en cepas aisladas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Enterococcus</i> spp.: .....	36
3.3.2. Determinación de genes de resistencia de antimicrobianos de importancia crítica en cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	37
3.3.2.1. Identificación de genes de betalactamas ( <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> y <i>bla</i> <sub>CMY</sub> )	37
3.3.2.2. Identificación de gen de resistencia a la tetraciclina ( <i>tetA</i> ) .....	38
3.3.2.3. Identificación de gen de resistencia a la colistina ( <i>mcr-1</i> a 5) .....	38
3.3.3. Determinación de genes de resistencia de importancia crítica en cepas de <i>Enterococcus</i> spp. ....	39
3.3.3.1. Identificación de gen de resistencia a la vancomicina ( <i>vanA</i> ) .....	39
3.3.3.2. Identificación de gen de resistencia a la tetraciclina ( <i>tetM</i> ) .....	39
3.4. Genotipificación de aislados de <i>Escherichia coli</i> mediante Electroforesis en Gel de Campo Pulsado. ....	40
3.4.1. Análisis Clonalidad .....	42
3.5. Análisis Estadístico .....	42

4. RESULTADOS .....	44
4.1. Aislamiento e identificación de cepas centinela en pinzones de Darwin ( <i>Geospiza</i> spp.).....	44
4.2. Determinación de resistencia a los antimicrobianos. ....	45
4.2.1. Determinación fenotípica y perfiles de resistencia a los antimicrobianos en <i>Escherichia coli</i> .....	45
4.2.2. Determinación de genes de resistencia a los antimicrobianos de importancia crítica en <i>Escherichia coli</i> .....	48
4.2.2.1. Identificación de genes de betalactamas ( <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> y <i>bla</i> <sub>CMY</sub> ) 48	
4.2.2.2. Identificación de gen de resistencia a la tetraciclina ( <i>tetA</i> ).....	50
4.2.2.3. Identificación de genes de resistencia a la colistina ( <i>mcr-1</i> a 5) .....	52
4.2.3. Determinación fenotípica de perfiles de resistencia a los antimicrobianos en <i>Enterococcus</i> spp. ....	53
4.2.4. Determinación de genes de resistencia a los antimicrobianos de importancia crítica en <i>Enterococcus</i> spp.....	56
4.2.4.1. Identificación de gen resistencia a la vancomicina ( <i>vanA</i> ) .....	56
4.2.5. Identificación del gen de resistencia a la tetraciclina ( <i>tetM</i> ) .....	56
4.3. Determinación fenotípica y perfiles de resistencia a los antimicrobianos en <i>Enterobacter</i> spp. ....	58
4.3.1. Determinación de genes de resistencia a los antimicrobianos de importancia crítica en <i>Enterobacter</i> spp. ....	60
4.3.1.1. Identificación de genes de betalactamas ( <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> y <i>bla</i> <sub>CMY</sub> ) 60	

4.3.1.2.	Identificación de gen de resistencia a la tetraciclina ( <i>tetA</i> ).....	63
4.3.1.3.	Identificación de genes de resistencia a la colistina ( <i>mcr-1</i> a 5) .....	65
4.4.	Resistencia antimicrobiana integral en pinzones de Darwin.....	65
4.5.	Genotipificación de aislados de <i>Escherichia coli</i> mediante Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE).....	66
5.	DISCUSIÓN.....	71
5.1.	Cepas centinela en pinzones de Darwin ( <i>Geospiza</i> spp.).....	71
5.2.	Resistencia fenotípica a los antimicrobianos en <i>Escherichia coli</i> .....	72
5.3.	Resistencia genotípica a los antimicrobianos en <i>Escherichia coli</i> .....	78
5.3.1.	Genes de betalactamasas ( <i>bla<sub>CTX-M</sub></i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i> , <i>bla<sub>SHV</sub></i> y <i>bla<sub>CMY</sub></i> ).....	78
5.3.2.	Gen de resistencia a la tetraciclina ( <i>tetA</i> ).....	82
5.3.3.	Genes de resistencia a la colistina.....	83
5.4.	Resistencia fenotípica a los antimicrobianos en <i>Enterococcus</i> spp. ....	84
5.5.	Perfil de resistencia genotípica a los antimicrobianos en <i>Enterococcus</i> spp. ....	88
5.5.1.	Resistencia a la vancomicina ( <i>vanA</i> ).....	88
5.5.2.	Gen de resistencia a la tetraciclina ( <i>tetM</i> ) .....	90
5.6.	Resistencia a los antimicrobianos en <i>Enterobacter</i> spp.....	91
5.6.1.	Resistencia fenotípica a los antimicrobianos en <i>Enterobacter</i> spp.....	91
5.6.2.	Resistencia genotípica a los antimicrobianos en <i>Enterobacter</i> spp.....	95
5.7.	Análisis de clonalidad por PFGE.....	97
6.	CONCLUSIONES.....	102
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	104

8.	ANEXOS.....	141
8.1.	ANEXO 1.....	141
8.1.1.	Aislamiento e Identificación Bioquímica de <i>Escherichia coli</i> .....	141
8.1.2.	Aislamiento e Identificación Bioquímica de <i>Enterococcus</i> spp. ....	141
8.2.	ANEXO 2.....	142
8.2.1.	Secuencia de primers, reacción de PCR y condiciones de termociclado del gen de resistencia a antimicrobianos en cepas aisladas de <i>Escherichia coli</i> .....	142
8.2.1.1.	Secuencia de primers, reacción de PCR y condiciones de termociclado de genes de Betalactamasas ( <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> y <i>bla</i> <sub>CMY</sub> ) (Dierikx y col., 2010; Hasman y col., 2005) .....	142
8.2.1.2.	Secuencia de primers, reacción de PCR y condiciones de termociclador del gen de resistencia a la tetraciclina ( <i>tetA</i> ) (Pantozzi, 2018) ..	146
8.2.1.3.	Secuencia de primers, reacción de PCR y condiciones de termociclador de genes de resistencia a la colistina ( <i>mcr-1</i> , <i>mcr-2</i> , <i>mcr-3</i> , <i>mcr-4</i> y <i>mcr-5</i> ) (Rebelo y col., 2018).....	147
8.3.	ANEXO 3.....	148
8.3.1.	Secuencia de primers, reacción de PCR y condiciones de termociclador del gen de resistencia a antimicrobianos en cepas aisladas de <i>Enterococcus</i> spp.....	148
8.3.1.1.	Secuencia de primers, reacción de PCR y condiciones de termociclador del gen de resistencia a la vancomicina ( <i>vanA</i> ) (Dutka-Malen y col., 1995).....	148
8.3.1.2.	Secuencia de primers, reacción de PCR y condiciones de	

termociclador del gen de resistencia a la tetraciclina (*tetM*) (Cochetti y col., 2005) 149

<b>8.4. ANEXO 4 .....</b>	<b>150</b>
8.4.1. Análisis Estadístico con el programa WinEpi© (2006).....	150
8.4.1.1. Tabla análisis estadístico de Chi cuadrado para diferencia de proporciones de cepas centinela del estudio.....	150
8.4.1.2. Tabla análisis estadístico de Chi cuadrado para diferencia de proporciones de cada bacteria centinela según la zona muestreada ( $p \leq 0,05$ ) ..	150
8.4.1.3. Tablas análisis estadístico de Chi cuadrado para diferencia de proporciones encontradas entre <i>Escherichia coli</i> y la RAM ( $p \leq 0,05$ ) .....	151
8.4.1.4. Tablas análisis estadístico de Chi cuadrado para diferencia de proporciones encontradas entre <i>Enterococcus</i> spp. y la RAM ( $p \leq 0,05$ ).....	151
8.4.1.5. Tablas análisis estadístico de Chi cuadrado para diferencia de proporciones encontradas en <i>Enterobacter</i> spp. y la RAM ( $p \leq 0,05$ ) .....	152

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación Ambler de Betalactamasas.....	9
<b>Tabla 2.</b> Parámetros de Inclusión de Cepas de <i>Escherichia coli</i> analizadas por la técnica de PFGE. ....	41
<b>Tabla 3.</b> Número y Porcentaje de Cepas Centinela Aisladas de Pinzones ( <i>Geospiza spp.</i> ) de acuerdo con la Zona de Muestreo en la Isla Santa Cruz. ....	44
<b>Tabla 4.</b> Diferencia de proporciones ( $p \leq 0,05$ ) de Cepas Centinela Aisladas de Pinzones ( <i>Geospiza spp.</i> ) de acuerdo con la Zona de Muestreo en la Isla Santa Cruz.....	45
<b>Tabla 5.</b> Perfil Fenotípico de Resistencia Antimicrobiana en Cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de Pinzones ( <i>Geospiza spp.</i> ) .....	47
<b>Tabla 6.</b> Perfil Fenotípico de Resistencia Antimicrobiana en Cepas de <i>Enterococcus spp.</i> aisladas de Pinzones ( <i>Geospiza spp.</i> ). ....	55
<b>Tabla 7.</b> Perfil Fenotípico de Resistencia Antimicrobiana en cepas de <i>Enterobacter spp.</i> aisladas de Pinzones ( <i>Geospiza spp.</i> ) .....	60
<b>Tabla 8.</b> Perfil Fenotípico y Genotípico de Resistencia Antimicrobiana en Cepas de Centinela aisladas de Pinzones ( <i>Geospiza spp.</i> ) .....	66

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismos Intrínsecos y Extrínsecos de Resistencia a los Antimicrobianos, tomada de (Troncoso y col., 2017). .....	5
<b>Figura 2.</b> Mecanismos de transferencia horizontal de genes (THG) tomado de (Furuya y Lowy, 2006) .....	6
<b>Figura 3.</b> Radiación Adaptativa en Pinzones de Darwin (Britania, 2022).....	21
<b>Figura 4.</b> Puntos de colección de muestras en la Isla Santa Cruz, Galápagos (fuente: ABG) .....	28
<b>Figura 5.</b> Instalación de red neblina en diferentes puntos de muestreo .....	29
<b>Figura 6.</b> Hisopado cloacal en pinzones terrestres de la Isla Santa Cruz .....	29
<b>Figura 7.</b> Marcaje de los pinzones con anillos de diferente color para cada zona	30
<b>Figura 8.</b> Proporción de RAM en cepas de Escherichia coli aisladas de las zonas urbana, agropecuaria y protegida de la Isla Santa Cruz.....	46
<b>Figura 9.</b> Producto de amplificación del gen bla <sub>TEM</sub> (A) y gen bla <sub>SHV</sub> (B) en las zonas agropecuaria (Be) y protegida (K) de la Isla Santa Cruz; control positivo (C+), control negativo (C-), marcador de peso molecular (L).....	49
<b>Figura 10.</b> Proporción de cepas de Escherichia coli fenotípicamente resistentes a la ampicilina en las que se identificaron los genes bla <sub>TEM</sub> , bla <sub>SHV</sub> en las zonas agropecuaria y protegida de la Isla Santa Cruz.....	50
<b>Figura 11.</b> Producto de amplificación del gen tetA en cepas de Escherichia coli correspondiente a las zonas urbana (B), agropecuaria (Be) y protegida (K) de la Isla Santa Cruz; control positivo (C+), control negativo (C-), marcador de peso molecular (L). .....	51
<b>Figura 12.</b> Proporción de cepas de Escherichia coli fenotípicamente resistentes a	

la tetraciclina en las que se identificó el gen tetA en las zonas urbana, agropecuaria y protegida de la Isla Santa Cruz.....	52
<b>Figura 13.</b> Muestras negativas en reacción Multiplex PCR para la identificación de los genes mcr-1 a mcr-5 en cepas de <i>Escherichia coli</i> de la zona agropecuaria (Be) y protegida (K) de la Isla Santa Cruz; control positivo (C+), control negativo (C-), marcador de peso molecular (L). .....	53
<b>Figura 14.</b> Proporción de RAM en cepas de <i>Enterococcus spp.</i> aisladas de las zonas urbana, agropecuaria y protegida de la Isla Santa Cruz.....	54
<b>Figura 15.</b> Muestras negativas para identificación por PCR del gen vanA en cepas de <i>Enterococcus spp.</i> de la zona urbana (B), agropecuaria (Be) y protegida (K) de la Isla Santa Cruz; control positivo (C+), control negativo (C-), marcador de peso molecular (L). .....	56
<b>Figura 16.</b> Ejemplo de productos de amplificación del gen tetM en cepas de <i>Enterococcus spp.</i> correspondientes a la zona urbana (B) de la Isla Santa Cruz; control positivo (C+), control negativo (C-), marcador de peso molecular (L). ...	57
<b>Figura 17.</b> Proporción de cepas de <i>Enterococcus spp.</i> fenotípicamente resistentes a la tetraciclina en las que se identificó el gen tetM en las zonas urbana, agropecuaria y protegida de la Isla Santa Cruz.....	57
<b>Figura 18.</b> Proporción de RAM en cepas de <i>Enterobacter spp.</i> aisladas de las zonas urbana, agropecuaria y protegida de la Isla Santa Cruz.....	59
<b>Figura 19.</b> Producto de amplificación del gen bla <sub>CTX-M</sub> en la zona agropecuaria (Be) de la Isla Santa Cruz; control positivo (C+), control negativo (C-), marcador de peso molecular (L). .....	61
<b>Figura 20.</b> Producto de amplificación del gen bla <sub>TEM</sub> (A), gen bla <sub>SHV</sub> (B) y bla <sub>CMY</sub>	

(C) en las zonas urbana (B), zona agropecuaria (Be) y protegida (K) de la Isla Santa Cruz; control positivo (C+), control negativo (C-), marcador de peso molecular (L). .....62

**Figura 21.** Proporción de cepas de *Enterobacter* spp. fenotípicamente resistentes a la ampicilina en las que se identificaron los genes bla<sub>CTX-M</sub>, bla<sub>TEM</sub>, bla<sub>SHV</sub> y bla<sub>CMY</sub> en las zonas agropecuaria y protegida de la Isla Santa Cruz. ....63

**Figura 22.** Producto de amplificación del gen tetA en cepas de *Enterobacter* spp. correspondientes a las zonas urbana (B), agropecuaria (Be) y protegida (K) de la Isla Santa Cruz; control positivo (C+), control negativo (C-), marcador de peso molecular (L). .....64

**Figura 23.** Proporción de cepas de *Enterobacter* spp. fenotípicamente resistentes a la tetraciclina en las que se identificó el gen tetA en las zonas agropecuaria y protegida de la Isla Santa Cruz. ....64

**Figura 24.** Dendograma de cepas de *Escherchia coli* aisladas de las zonas urbana, agropecuaria y protegida de la Isla Santa Cruz. UPGMA-Bionumerics 8.0. ....67

**Figura 25.** Dendograma de cepas de *Escherchia coli* aisladas de la zona urbana de la Isla Santa Cruz. UPGMA-Bionumerics 8.0. ....68

**Figura 26.** Dendograma de cepas de *Escherchia coli* aisladas de la zona agropecuaria de la Isla Santa Cruz. ....69

**Figura 27.** Dendograma de cepas de *Escherchia coli* aisladas de la zona protegida de la Isla Santa Cruz. ....70

## ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

**A:** Ampicilina

**ABG:** Agencia De Regulación y Control de la Bioseguridad y Cuarentena para Galápagos

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**AGISAR:** Grupo Asesor sobre Vigilancia Integrada de la Resistencia a los Antimicrobianos

**a.m.:** antes del mediodía

**AmpC:** Ampicillinase C

**ATCC:** American Type Culture Collection

**B:** Zona Urbana

**Be:** Zona Agropecuaria

**BLEE:** Betalactamasas de Espectro Extendido

**BHI:** Brain Heart Infusion Broth

**C:** Cefotaxima

**CDC:** Centers for Disease Control and Prevention

**C+:** Control Positivo

**C-:** Control Negativo

**°C:** Centígrados

**CI:** Ciprofloxacina

**CIM:** Concentración Mínima Inhibitoria

**C1:** Criterio uno

**C2:** Criterio dos

**CL:** Cloranfenicol

**CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute

**CMY:** Betalactamasa de tipo AmpC

**CTX-M:** Cefotaxime Resistant – Munich

**EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic acid

**EE. UU.:** Estados Unidos

**EMA:** European Medicines Agency

**F:** Cefoxitina

**FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

**FE:** Cefepima

**FOX:** Active on cefoxitin

**GM:** Gentamicina

**GRA:** Genes de Resistencia a los Antimicrobianos

**IC:** Intervalo de Confianza

**IMI:** imipenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase

**IMP:** active-on-imipenem

**INEC:** Instituto Nacional de Estadísticas y Censos

**K:** Zona Protegida

**Kb:** Kilobases

**KPC:** *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemasa

**L:** Marcador de Peso Molecular (Ladder)

**LAP:** Leucino aminopeptidasa

**MALDI-TOF MS:** Matrix-Assisted Laser Desorption - Ionisation-Time of Flight  
Mass Spectrometry.

**mcr:** Gen de resistencia a la Colistina

**mec:** Gen de resistencia a la Meticilina

**MDR:** Multidrug Resistance

**mg:** Miligramos

**MIR:** Discovered at Miriam Hospital

**ml:** Mililitro

**MLST:** Multilocus Type Sequencing

**mM:** Milimolar

**n:** Número

**NaCl:** Cloruro de Sodio

**NDM:** New Delhi metallo-beta-lactamase

**OIE:** Organización Mundial de Sanidad Animal

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**OXA:** Active on oxacillin

**p:** Probabilidad

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa

**P99:** From *Enterobacter cloacae* strain P99

**pb:** Pares de Bases

**pH:** Potencial de Hidrógeno

**PNG:** Parque Nacional Galápagos

**PMB:** Pinzón terrestre muestra urbana

**PMBE:** Pinzón terrestre muestra agropecuaria

**PMK:** Pinzón terrestre muestra protegida

**PER:** *Pseudomonas* extended resistance

**PFGE:** Electroforesis en Gel de Campo Pulsado

**PTMB:** Pinzón terrestre urbano

**PTMB<sub>e</sub>:** Pinzón terrestre agropecuaria

**PTMK:** Pinzón terrestre protegida

**PYR:** Pirrolidonilarilamidasas

**RAM:** Resistencia a los Antimicrobianos

**r.p.m.:** Revoluciones por minuto

**S:** Estreptomicina

**SARM:** *Staphylococcus aureus* Resistente a la Meticilina

**SKG:** Seakem Gold Agarose

**SHV:** Sulphydral Variable

**SME:** *Serratia marcescens* enzyme

**spp:** Especies

**S:** South

**STEC:** *Escherichia coli* Shigatoxigénica

**SXT:** Timetoprima Sulfametoxazol

**T:** Tetraciclina

**TBE:** TBE or Tris/Borate/EDTA

**TC:** Teicoplanina

**TEM:** Betalactamasa de Espectro Extendido (Temoniera in Greece)

**tet / otr:** genes de resistencia a tetraciclina

**THG:** Transferencia Horizontal de Genes

**μl:** Microlitro

**UNESCO:** Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y

la Cultura

**UNIETAR:** Unidad de Enfermedades Transmitidas por Alimentos y Resistencia a los Antimicrobianos.

**UPGMA** Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

**U:** Unidades

**UV:** Ultravioleta

**V:** Voltios

**VA:** Vancomicina

**van:** Genes de resistencia a la vancomicina

**VEB:** Vietnam extended spectrum beta-lactamase.

**VIM:** Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase

**VRE:** Vancomycin Resistant

**W:** West

**WGS:** Whole Genome Sequencing

**WHO:** World Health Organization

***XbaI:*** Enzima obtenida de *Xanthomonas badrii*

## RESUMEN

### **Determinación de Perfiles de Resistencia a los Antimicrobianos de Importancia Crítica en Cepas de *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp. Aislados de Pinzones Terrestres (*Geospiza* spp.) de la Isla Santa Cruz en Galápagos**

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) fue declarada por la Organización Mundial de la Salud como un desafío del siglo 21. La RAM debe ser monitorizada a través de un control intersectorial, incluyendo salud humana, animal y ambiente. Los animales silvestres son bioindicadores de contaminación ambiental, siendo las aves centinelas de RAM en diferentes ecosistemas. En este estudio, se identificaron los perfiles fenotípicos y genotípicos de resistencia a los antimicrobianos de importancia crítica en pinzones de Darwin. Se colectaron muestras de hisopados cloacales (n= 384) de pinzones de tres zonas de la Isla Santa Cruz, Galápagos, Ecuador. En cepas de *Escherichia coli* (n= 136) se observó un porcentaje significativo ( $p \leq 0,05$ ) de RAM para ampicilina (50%), tetraciclina (31,6%), trimetoprima sulfametoxazol (14,7%) y cloranfenicol (11,1%); los tres últimos tuvieron una mayor proporción en la zona agropecuaria. Además, se identificaron los genes de resistencia a betalactamasas, tetraciclina y colistina en cepas de *E. coli*. Se identificó el gen *bla*<sub>TEM</sub> en el 23,5% y el gen *bla*<sub>SHV</sub> en el 1,5% de cepas fenotípicamente resistentes a la ampicilina. El gen *tetA* se identificó en el 83,7% de cepas fenotípicamente resistentes a la tetraciclina. No se identificaron genes de resistencia a colistina (*mcr*-1 a *mcr*-5). Por otro lado, en *Enterococcus* spp. se observó un porcentaje significativo de resistencia ( $p \leq 0,05$ ) a la tetraciclina (19,75%), estreptomycin (6,92%) y

ciprofloxacina (5,7%). La zona agropecuaria fue la de mayor proporción. Se identificó el gen *tetM* en el 75,4% de las cepas de *Enterococcus* fenotípicamente resistentes a la tetraciclina; no se identificó el gen *vanA*. Los resultados de RAM mostraron un posible impacto antropogénico asociado a las actividades agropecuarias de la Isla. No se evidenció clonalidad por PFGE en cepas de *E. coli*, sin embargo, se deberían realizar otros análisis para determinar las variables asociadas a la RAM en este nicho ecológico.

**Palabras Clave:** Resistencia Antimicrobiana, *Escherichia coli*, *Enterococcus*, pinzones, Galápagos.

## ABSTRACT

### **Determination of Critically Important Resistance Antimicrobial Profiles in *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. strains, Isolated from Ground Finches (*Geospiza* spp.) from Santa Cruz Island, Galapagos.**

The World Health Organization declared antimicrobial resistance (AMR) as a challenge for the 21st century. AMR must be monitored across an intersectional approach, controlling human, animal, and environmental health. Wild animals are bioindicators of environmental contamination; birds are the main sentinels of AMR in different ecosystems. In this study, we determine phenotypic and genotypic AMR profiles to critically important antimicrobials in Darwin's finches. Cloacal swab samples (n= 384) were collected from finches in 3 areas of Santa Cruz Island in Galapagos. A significant percentage ( $p \leq 0.05$ ) of AMR was observed in *Escherichia coli* strains (n= 136) for ampicillin (50%), tetracycline (31.6%), trimethoprim sulfamethoxazole (14.7%) and chloramphenicol (11.1%); the last three antibiotics presented a higher percentage in the agricultural zone. In addition, beta-lactamase, tetracycline and colistin resistance genes were analyzed. The *bla*<sub>TEM</sub> gene was observed in 23.5% and *bla*<sub>SHV</sub> in 1.5% of phenotypic ampicillin resistant *E. coli* strains. The *tetA* gene was identified in 83.7% of phenotypic tetracycline resistant strains. Colistin resistance genes (*mcr-1* to *mcr-5*) were not identified. On the other hand, *Enterococcus* spp. presented a higher

percentage of resistance ( $p \leq 0.05$ ) to tetracycline (19.75%), streptomycin (6.92%) and ciprofloxacin (5.7%). A greater AMR percentage was observed in the agricultural zone. The *tetM* and *vanA* genes were analyzed in *Enterococcus*. The *tetM* gene was identified in 75.4% of phenotypic tetracycline resistant strains; the *vanA* gene was not identified. The results of AMR showed a possible anthropogenic impact associated with agricultural activities on the Island. Clonality was not evidenced by PFGE in *E. coli* strains, however, further analyzes should be carried out, in order to determine the variables associated with AMR in this ecological niche.

**Keywords:** Antimicrobial Resistance, *Escherichia coli*, *Enterococcus*, finches, Galapagos.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Resistencia a los antimicrobianos (RAM)

Desde el surgimiento de los antibióticos a inicios del siglo XX, estas moléculas cambiaron la medicina, salvando millones de vidas (Crofts y col., 2017). Por lo tanto, que infecciones que eran causa común de muerte en seres humanos, ya no lo eran; se dio fin a la era pre-antibiótica, y fue posible realizar intervenciones tales como trasplantes de órganos, tratamientos contra el cáncer, cirugías mayores, entre otros (Wright, 2010).

Los antibióticos, poseen una toxicidad selectiva, de la cual dependerá el que puedan destruir, o solamente inhibir a las bacterias, es decir que sean bactericidas o bacteriostáticos (Quinn y col., 2011). Se conoce, que las diferencias bioquímicas de la estructura de la célula bacteriana, así como la vía metabólica de las mismas, explicaría de alguna manera esta toxicidad (Quinn y col., 2011).

Existen 5 blancos principales de acción antimicrobiana: la pared celular, membrana celular, la síntesis proteica, la síntesis de ácidos nucleicos y el metabolismo del ácido fólico (Wright, 2010)

Pese a que los antibióticos poseen características únicas a diferencia de otras drogas, las bacterias también poseen mecanismos que les permiten evadirlos, lo que conocemos como resistencia antimicrobiana (RAM) (Wright, 2010).

Es importante considerar, que la RAM es un proceso natural, es decir que la resistencia que actualmente vemos en la clínica, así como a nivel comunitario o ambiental, paralelamente es intrínseca o innata de algunas bacterias (Wright,

2010). Evolutivamente, los microorganismos debido a factores como la presión de selección, mutaciones al azar, o adquisición de determinantes genéticos, han logrado evadir la acción de los antimicrobianos. Se debe tener en cuenta, que los antibióticos son producidos en su mayoría de forma natural, ya sea por microorganismos, tales como hongos o incluso bacterias saprofíticas (Holmes y col., 2016). Por tanto, se podría decir que este mecanismo de protección o de resistencia a los antimicrobianos sería parte de un proceso de selección natural, dado por la competencia entre las bacterias y las moléculas derivadas de microorganismos naturales (Holmes y col., 2016)

Es así, que hoy en día se conoce como resistoma a la colección de genes relacionados con la resistencia a los antimicrobianos, en un ambiente dado (Wright, 2007). Dentro del resistoma se consideran genes de resistencia intrínsecos (transferencia vertical; específicos de especie), adquiridos (transferencia horizontal o vertical; no específicos de especie), protoresistencia (sensibilidad fenotípica; con poca o sin actividad hasta que mute) y de resistencia encriptada o silenciosa (sensibilidad fenotípica; funcional pero no expresada) (Kim y Cha, 2021). Además, se contemplaría que el origen evolutivo de genes de resistencia de relevancia clínica estaría en el ambiente (Crofts y col., 2017).

En lo que respecta al resistoma ambiental, los genes son transferidos horizontalmente de diversos entornos o ecosistemas. Este paso de genes de resistencia antimicrobiana se da por acción de elementos móviles de las bacterias, que en conjunto se conocen como moviloma (Siefert, 2009).

El identificar el concepto resistoma en el 2006, permitió de alguna manera tener

un mejor entendimiento sobre el origen de la RAM. Su control se lo realiza interseccionalmente, a través del concepto de Una Sola Salud (Kim y Cha, 2021).

### **1.1.1. Importancia de la resistencia a los antimicrobianos**

La resistencia a los antimicrobianos constituye un problema multifactorial, que pone en riesgo la salud humana y animal, como también la economía y la seguridad mundial (White y Hughes, 2019). La RAM, se considera como un desafío global para la humanidad en el siglo XXI (WHO, 2014). Se estima que para el año 2050, las infecciones causadas por bacterias RAM, se convertirán en la principal causa de muerte en humanos (O'Neill, 2016).

Los genomas bacterianos han evolucionado y adquirido determinantes genéticos de resistencia a los antimicrobianos; existen nuevos mecanismos de resistencia, pero pese al aumento de la amenaza de patógenos resistentes, no se han descubierto nuevas moléculas antimicrobianas (Thakur y Gray, 2019). Se ha visto actualmente, una disminución en la eficacia de los antibióticos, dejando pocas alternativas de tratamiento de infecciones clínicas tanto en humanos como en animales. Este inconveniente se da, en parte, a un aumento en la presión de selección dado por el uso inadecuado de los antibióticos (Quinn y col., 2011).

### **1.1.2. Clasificación de los antimicrobianos de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud**

Dada la importancia de las consecuencias que acarrea la RAM, un grupo de expertos representando a la OMS, OIE y FAO, consideraron la creación de una lista de antimicrobianos de importancia crítica. Esta lista se ha ido actualizando

anualmente, siendo la última versión la del 2018 (OMS, 2018).

La clasificación de los antimicrobianos permite orientar el mejor uso de antibióticos para el tratamiento de infecciones bacterianas críticas en humanos (WHO, 2007). Los criterios que se tomaron en cuenta para evaluar la calificación de los antimicrobianos estuvieron su uso en varias áreas, incluyendo la veterinaria, en la que estos son utilizados no solo como terapéuticos, sino también como profilácticos o incluso, como promotores de crecimiento en animales (OMS, 2018).

La OMS, clasificó los antimicrobianos en críticamente importantes, muy importantes e importantes (OMS, 2019).

Criterio 1 (C1): Si el antibiótico es la única o una de las pocas alternativas disponibles para el tratamiento de una infección bacteriana grave en humanos.

Criterio 2 (C2): Si el antibiótico es utilizado para tratar infecciones causadas por bacterias transmitidas por fuentes no humanas o que pueden adquirir genes de resistencia antimicrobiana, de fuentes no humanas.

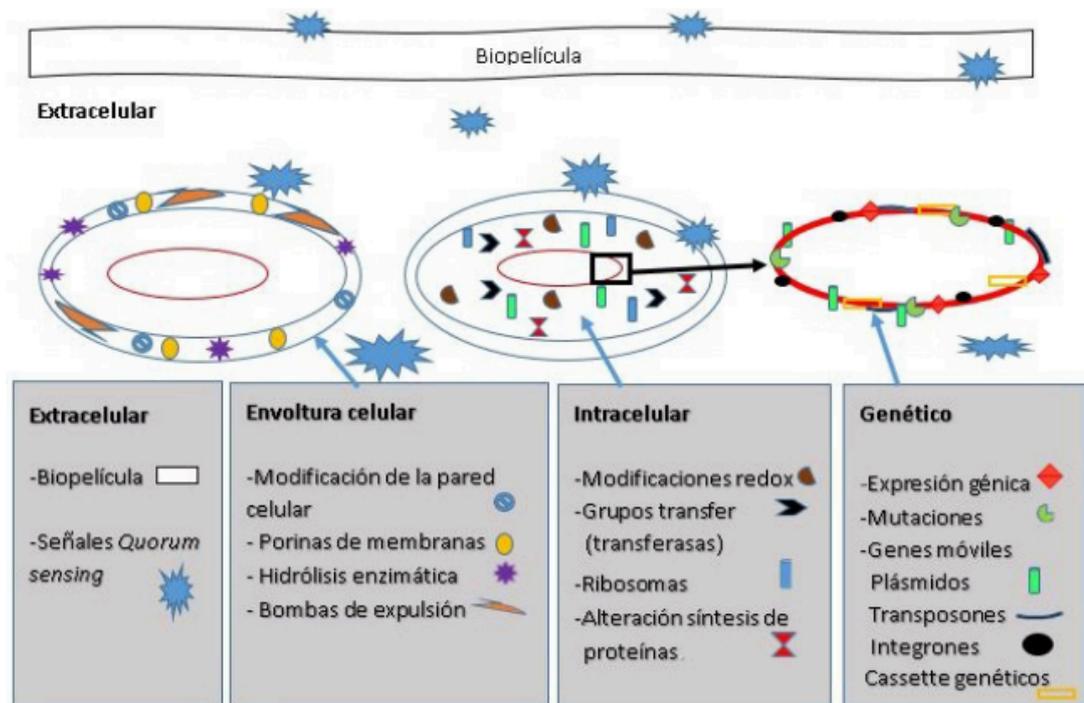
En este contexto, los antimicrobianos críticamente importantes, son los que cumplen con los dos criterios (C1 y C2). Los antibióticos altamente importantes, los que cumplen con uno de los dos criterios, y los importantes, corresponden a los antibióticos de uso humano que no están categorizados dentro de ninguno de los dos criterios (OMS, 2018).

En el 2009 la OMS determinó la necesidad de implementar un plan estratégico, conformando a un Grupo Asesor sobre Vigilancia Integrada de la Resistencia a los

Antimicrobianos (AGISAR), quienes en el 2013 publicaron por primera vez el plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos, realizando un segundo plan en el 2015 (WHO / AGISAR, 2017). El objetivo principal de esta integración, fue apoyar a la OMS y a los Estados miembros, a implementar el plan mundial de acción contra la RAM (WHO / AGISAR, 2017).

### 1.1.3. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos

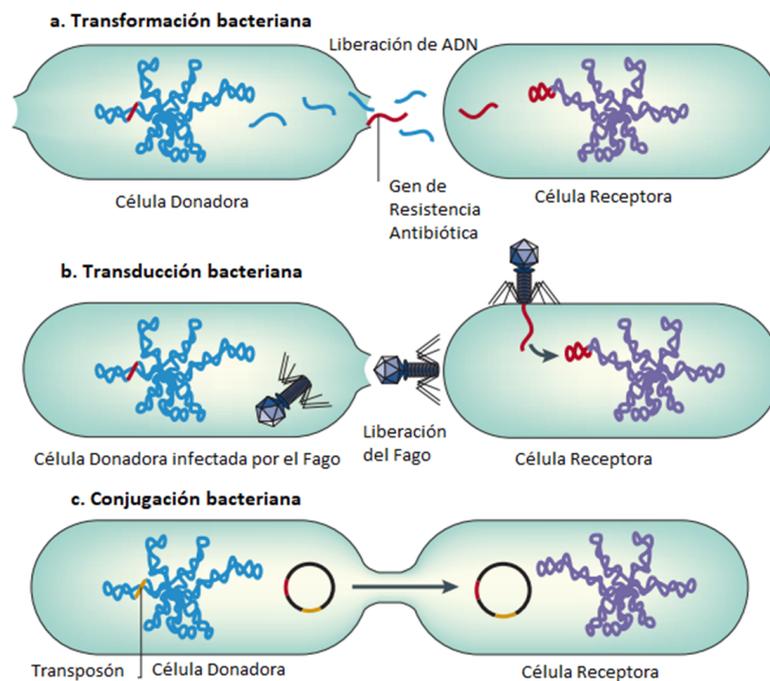
Las bacterias puede evadir la acción de un antimicrobiano, a través de factores estructurales o funcionales de acción intracelular (intrínseco) o extracelular (adquirido) (ver figura 1) (Troncoso y col., 2017).



**Figura 1.** Mecanismos Intrínsecos y Extrínsecos de Resistencia a los Antimicrobianos, tomada de (Troncoso y col., 2017).

La forma intrínseca de RAM, es codificada a través del cromosoma y está relacionada tanto con la fisiología, como por las propiedades existentes de la bacteria (Quinn y col., 2011). Es decir, cambios en los procesos de óxido-reducción, modificación del blanco de acción con inactivación de grupos de transferencia, e inhibición de síntesis proteica por modificación a nivel ribosomal (Troncoso y col., 2017).

Los mecanismos intracelulares de intercambio genético lateral y horizontal que



**Figura 2.** Mecanismos de transferencia horizontal de genes (THG) tomado de (Furuya y Lowy, 2006)

pueden intervenir en la RAM son la conjugación, la transducción y la transformación (ver figura 2) (Quinn y col., 2011).

Extracelularmente, las bacterias pueden ser resistentes a los antimicrobianos, ya sea por la formación de biopelículas, *quorum sensing*, cambios en la envoltura celular (regulación de porinas o bombas de eflujo), o modificaciones del sitio diana de acción de los antibióticos (Torres, 2012; Troncoso y col., 2017).

La forma extrínseca de RAM, se relaciona con mutaciones o la transferencia horizontal de genes de resistencia a través de elementos móviles de las bacterias (Partridge y col., 2018). Las mutaciones se podrían observar como una ventaja evolutiva de las bacterias, ya que al aumentar la variabilidad genética, incrementa también las probabilidades de adquirir resistencia a los antimicrobianos (Torres, 2012).

Por otro lado, los elementos genéticos móviles, están relacionados en gran medida a la adquisición, acumulación y la dispersión de genes de resistencia antimicrobiana (Partridge y col., 2018). Algunos elementos genéticos, tales como secuencias de inserción o transposones, pueden moverse aleatoriamente y ubicarse en sitios nuevos, ya sea en la misma región de ADN del organismo, o en uno diferente; mientras que otros como los integrones, poseen sitios específicos de recombinación (Partridge y col., 2018). A su vez, los plásmidos son elementos genéticos móviles capaces de auto replicarse y que contienen genes de resistencia antimicrobiana (Thomas, 2000).

#### **1.1.4. Resistencia a los betalactámicos**

A partir del descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928, existió el interés de elucidar el mecanismo de acción de los antimicrobianos betalactámicos (King y col., 2017). Existen 4 clases estructuralmente diferentes de

betalactámicos, los cuales poseen diferentes propiedades farmacológicas y baja toxicidad. Estos son: las penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos (King y col., 2017). El mecanismo general de acción de los betalactámicos involucra la inhibición de la síntesis de la pared de peptidoglicano de procariontes e induce la lisis de la bacteria (Quinn y col., 2016).

Las betalactamasas son enzimas producidas por algunas bacterias, que hidrolizan el anillo betalactámico en el enlace amida, interrumpiendo la acción del antimicrobiano. Existen dos sistemas de clasificación: uno basado en el sistema, de Bush-Jacoby-Medeiros, y otro basado en la secuencia de Ambler (Tooke y col., 2019). Esta última, se categoriza en A, B, C y D (ver tabla 1) (Lima y col., 2020).

Cabe destacar, que el amplio uso de betalactámicos tanto en medicina humana, como en la práctica agropecuaria, ha aumentado de tal manera la presión de selección, que hoy en día no existe ningún antibiótico dentro de este grupo, del que no se haya descrito resistencia (King y col., 2017).

**Tabla 1.** Clasificación Ambler de Betalactamasas

Tipo	Clase Molecular de Ambler	Característica	Ejemplos
Betalactamasa de bajo espectro	A	Hidrolizan la penicilina; producidas de manera primaria por la familia <i>Enterobacteriaceae</i> Hidrolizan antibióticos	Penicilinas de <i>Staphylococcus aureus</i> ; TEM-1 TEM-2, SHV-1
Betalactamasa de espectro extendido	A	Betalactámicos de bajo y espectro extendidos	SHV-2, CTX-M15, PER-1, VEB-1
Carbapenemasas de Serina	A	Hidrolizan Carbapenémicos	KPC-1, IMI-1, SME-1
Metallo-Betalactamasas	B	Hidrolizan Carbapenémicos	VIM-1, IMP-1, NDM-1
Cefalosporinas	C	Hidrolizan cefamicinas y algunos oxymino betalactámicos; inducible; cromosómica	AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
Enzimas tipo OXA	D	Hidrolizan oxacilina, oxymino betalactámicos y carbapenémicos; producido por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter baumannii</i>	Enzimas OXA

Adaptado de Toussaint y col., (2015)

### 1.1.5. Resistencia a la colistina

La colistina es una polimixina, la cual es considerada un polipéptido catiónico, que posee un amplio espectro de acción contra bacterias gramnegativas (Liu y col., 2015).

El blanco de estos polipéptidos es a nivel del lipopolisacárido de las bacterias gramnegativas; su acción bactericida se debe a la interacción directa con el lípido A, el cual al tener carga negativa por los grupos fosfato que posee, permite el aumento de la permeabilidad de la membrana externa por el efecto anfipático de la polimixina, (Velkov y Thompson, 2010).

Se conoce que la colistina posee acción bactericida en los *Enterobacteriales*, dentro de los cuales se incluye *E.coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Salmonella* y *Shigella*, entre otras bacterias gramnegativas de relevancia clínica (Binsker y col., 2022). En el 2015, se reporta por primera vez la resistencia plasmática a la

colistina en aislados animales y humanos, determinada como mobile-colistin resistance (*mcr-1*) (Liu y col., 2015). Actualmente se han identificado 10 genes *mcr* (*mcr-1* al *mcr 10*), siendo este último identificado en China de un aislado clínico de *Enterobacter roggenkampii* (Wang y col., 2020) .

Definitivamente, no se puede desestimar la presencia de genes de resistencia plasmídica a la colistina, más aun tomando en cuenta que existen limitadas opciones para el tratamiento de bacterias gramnegativas resistentes. Análisis metagenómicos, indican que la distribución ambiental de las variantes de genes *mcr*, dependerían del sitio y la fuente de muestreo, por lo que se debe monitorear de manera constante (Martiny y col., 2022).

#### **1.1.6. Resistencia a la vancomicina**

La vancomicina es un glicopéptido que estuvo disponible para su uso clínico, y que pronto fue reemplazado por otros antimicrobianos más eficientes y menos tóxicos (Levine, 2006). El mecanismo de acción de los glicopéptidos, se basa en la inhibición de la síntesis de la pared de las bacterias grampositivas, evitando el entrecruzamiento de peptidoglucano por la unión del extremo D-alanil-D-alanina del precursor de la pared celular del lípido II (Zeng y col., 2016), tales como: *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, entre otras especies (Zeng y col., 2016).

Actualmente, los glicopéptidos son utilizados como último recurso para el tratamiento de infecciones por bacterias grampositivas MDR (Périchon y Courvalin, 2012). La vancomicina es el más antiguo de los glicopéptidos que se sigue utilizando en medicina humana, y que además se encuentra en la lista de

antimicrobianos de importancia crítica de la OMS ( Zeng y col., 2016; OMS, 2018;). La clasificación de la resistencia a los glicopéptidos, se fundamenta en la secuencia primaria del gen estructural de resistencia a la ligasa. En cuanto a la resistencia plasmídica, se han descrito 8 tipos de genes de resistencia, los cuales son: *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanF*, *vanG* y *vanL* (Périchon y Courvalin, 2012).

Hoy en día podemos evidenciar el aumento de la resistencia a la vancomicina, resultado de la presión de selección por el uso de glicopéptidos con infecciones por SARM (Butler y col., 2014); sin embargo los genes de resistencia han sido identificados en cepas de más 400 000 años de antigüedad, determinando que existiría un reservorio de resistencia innata en el microbioma (Dcosta y col., 2011).

#### **1.1.7. Resistencia a la tetraciclina**

La tetraciclina es un antibiótico bacteriostático de amplio espectro, que actúa tanto contra patógenos grampositivos como gramnegativos. Por muchos, fue considerado un antibiótico ideal, debido a su seguridad, tolerabilidad, así como por la disponibilidad de administración parenteral y oral (Grossman, 2016).

La tetraciclina actúa a nivel de la subunidad 30S del ribosoma, interfiriendo con la unión del aminocil-tRNA en su lugar de unión en el ribosoma, evitando así la síntesis proteica y por tanto con la adición de aminoácidos a la cadena peptídica ( Quinn y col., 2011; Marosevic y col., 2017). Debido a sus propiedades antes mencionadas, y en consecuencia su uso extensivo en medicina humana y veterinaria, se mantuvo un patrón de selección para la resistencia de este

antimicrobiano (Thaker y col., 2010). Desde el punto de vista clínico, los principales mecanismos de resistencia que presentan las bacterias a este antibiótico, son a través de la activación de bombas de eflujo y protección ribosomal (Rossolini y col., 2017).

En lo que respecta a la resistencia por activación de bombas de eflujo desde la célula bacteriana, existen 26 mecanismos descritos en bacterias gramnegativas y grampositivas (Thaker y col., 2010); de estos, 18 clases de bombas de eflujo, fueron clasificadas en 6 grupos por Chopra (2001<sup>a</sup>); posteriormente, Roberts clasificó 5 grupos más. Estos son: *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)*, *tet(H)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tetA(P)*, *tet(V)*, *tet(Y)*, *tet(Z)*, *tet(30)*, *tet(31)*, *tet(33)*, *tet(35)*, *tet(38)*, *tet(39)*, *tet(40)*, *tet(41)*, *tet(42)*, *tcr(3)*, *otr(C)* y *otr(B)* (Thaker y col., 2010).

Por el contrario, la resistencia a las tetraciclinas relacionada con proteínas de protección al ribosoma, reducen la permeabilidad del antimicrobiano a través de modificaciones de forma y reducción de la expresión de porinas (Markley y Wencewicz, 2018); no son comunes las mutaciones ribosomales. Los genes de protección ribosómica son: *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(Q)*, *tet(S)*, *tet(T)*, *tet(W)*, *tetB(P)*, *tet(32)*, *tet(36)*, *otr(A)* y *tet* (Thaker y col., 2010).

Hay que resaltar, que los mecanismo de resistencia a la tetraciclina asociados a mecanismos de eflujo, son más frecuentes en bacterias gramnegativas, mientras, que los mecanismos de protección ribosomal, están más asociados a grampositivas (Bryan y col., 2004; Chopra y Roberts, 2001b).

## **1.2. Bacterias centinela para la determinación de la RAM**

### **1.2.1. *Escherichia coli***

*Escherichia coli* es un bacilo gramnegativo anaerobio facultativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*; dentro de sus principales características esta, el ser fermentadora de glucosa y lactosa, ser oxidasa negativa y no formar esporas (Quinn y col., 2011). Esta bacteria, es una de las primeras en colonizar al nacimiento, persistiendo como parte de la microbiota normal del intestino del hombre y de animales (Quinn y col., 2011). Es así, que *E. coli* es una bacteria comensal, que generalmente vive en simbiosis con su hospedador, pero que puede causar infecciones de tipo oportunista (Allocati y col., 2013). Sin embargo, también existen tipos patógenos que pueden ser responsables de diversos procesos infecciosos (Allocati y col., 2013).

*Escherichia coli* es una bacteria de importancia clínica y ambiental que se encuentra ampliamente distribuida en varios ecosistemas naturales y también es agente causal de infecciones primarias u oportunistas en humanos y animales (Janda y Abbott, 2021). En este sentido, *E. coli* cumple con todas las características importantes, necesarias para la determinación de patrones de resistencia a los antimicrobianos en distintos ambientes por lo que puede ser usada como un organismo centinela ambiental de RAM (Torres, 2012).

### **1.2.2. *Enterococcus spp.***

Los *Enterococcus*, son bacterias Gram positivas anaerobias facultativas, catalasa negativas y no formadoras de esporas ( Fisher y Phillips, 2009; Byappanahalli y

col., 2012). Este género bacteriano, habita generalmente en el tracto gastrointestinal de humanos y animales (Fisher y Phillips, 2009). Además, estas bacterias son ubicuas y capaces de sobrevivir en diferentes nichos ambientales así como a altas temperaturas, grandes rangos de pH (entre 4.5 y 10) y a altas concentraciones de sal (Fisher y Phillips, 2009; García y Rice, 2019).

Todas estas características conllevan a que sea un género bacteriano de importancia en salud humana. Además, su variabilidad les permite adaptarse fácilmente en ambientes hospitalarios y ser causantes de infecciones nosocomiales (García y Rice, 2019). Estas bacterias también han sido aisladas del suelo, sedimentos, agua dulce y salada, plantas, aguas residuales, entre otros (Zaheer y col., 2020)

Es importante destacar, que *Enterococcus* es capaz de desarrollar resistencia a casi todos los antibióticos utilizados en la clínica, a través de diferentes mecanismos genéticos (Miller y col., 2014). Existen *Enterococcus* multiresistentes que actúan sobre los antibióticos a través de la inactivación de estos agentes, la expresión de bombas de eflujo, así como también de adaptaciones en su envoltura celular (Miller y col., 2014).

En este contexto, y tomando en consideración las características que debe tener una bacteria para poder determinar patrones de selección antimicrobiana, los *Enterococcus* son considerados como bacterias grampositivas centinela de la RAM (Torres, 2012).

### **1.3. Resistencia a los antimicrobianos en fauna silvestre**

La identificación de factores que permitan evaluar el efecto tóxico de agentes liberados al ambiente, tales como plaguicidas, metales pesados, medicamentos, entre otros, es importante a fin de proteger la salud humana y de los ecosistemas (Gorla, 2016). El ambiente ha sido visto por mucho tiempo como un depósito pasivo de mecanismos de RAM. Se ha pensado que al no existir eventos de presión selectiva en nichos naturales, esta resistencia a los antimicrobianos desaparecería de las comunidades bacterianas ambientales; sin embargo se ha evidenciado que esto no es así (Chamosa y col., 2017).

A su vez, es prioritario identificar animales centinela en diferentes ambientes, que permitan detectar la presencia o el efecto de agentes contaminantes en el ecosistema (Gorla, 2016). Considerando el impacto de la RAM a nivel mundial, es importante el comprender la dinámica de los mecanismos de la resistencia y de cómo se mantienen dentro de las poblaciones bacterianas en el ambiente (Vittecoq y col., 2016).

Los análisis en fauna silvestre han permitido obtener conocimiento sobre el rol del moviloma en la diseminación de RAM y resistencia plasmídica (Alonso y col., 2021). Por otro lado, también han permitido conocer acerca de la asociación entre animales silvestres y el impacto antropogénico en el ambiente (Ramey y Ahlstrom, 2020). A su vez, gracias a los estudios en fauna silvestre, se han determinado mecanismos de adquisición, intercambio y diseminación de genes de resistencia (Ramey y Ahlstrom, 2020). De ahí la importancia de estudiar la RAM en animales silvestres en diferentes ecosistemas.

### 1.3.1. Resistencia a los antimicrobianos en aves silvestres

Se ha propuesto a las aves silvestres, como centinelas, reservorios y diseminadores de la resistencia a los antimicrobianos (Bonnedahl y Järhult, 2014). A través de las aves se puede determinar el impacto ambiental de la RAM debido a la amplia diversidad de nichos ecológicos en los que habitan; además de ser agentes dispersores de genes de resistencia antimicrobiana, debido a su habilidad de migrar a largas distancias por cortos períodos de tiempo y constituir posibles fuentes de bacterias resistentes en humanos (Bonnedahl y Järhult, 2014)

Algunos estudios han identificado RAM en diversas aves silvestres, un ejemplo es el de Radhouani y col., (2012), quienes identificaron un alto porcentaje de resistencia a la tetraciclina, estreptomicina y betalactámicos en *E. coli*, aislada de busardos ratoneros (*Buteo buteo*) en Portugal. A su vez, se observó una alta resistencia a la tetraciclina y eritromicina en *Enterococcus*, así como cepas MDR (Radhouani y col., 2012).

Giacopello y col., (2016) determinaron la frecuencia de perfiles de RAM en cepas de enterobacterias aisladas de hisopados cloacales de aves silvestre (paseriformes y acuáticas) en Italia. Los resultados demostraron la presencia de cepas MDR, resistentes a 3 o más grupos de antimicrobianos, pero no identificaron cepas BLEE. Por otro lado, Mukerji y col., (2020), determinaron la presencia de resistencia a los antimicrobianos de importancia crítica en cepas de *E. coli* procedentes de cuatro especies diferentes de aves silvestres de un ambiente costero en Australia. Otros estudios también han aislado *Enterococcus* resistentes en aves silvestres migratorias; tal es el caso de Ben Yahia y col., (2018), quienes

determinaron perfiles fenotípicos y genotípicos de resistencia en aves silvestres de Túnez. Zeballos y col., en el (2021) realizan una amplia revisión bibliográfica que abarcó estudios realizados en resistencia antimicrobiana en gaviotas. En este contexto, las gaviotas han sido vistas como agentes diseminadores y centinelas de RAM, tanto de fuentes de origen antropogénico, como de otros reservorios en ambientes acuáticos (Zeballos y col., 2021).

### **1.3.2. Resistencia a los antimicrobianos en aves passeriformes**

Los passeriformes, son un orden de aves que habitan en ecosistemas terrestres. A este grupo, pertenecen gorriones, canarios, estorninos, pinzones, cuervos, entre otros (Bateson y Feenders, 2010). En términos generales, los passeriformes son aves ecológica, morfológica y conductualmente diferentes, siendo un modelo importante de investigación biológica (Bateson y Feenders, 2010).

Existen diversos estudios de resistencia a los antimicrobianos realizados en passeriformes, así como en otras aves silvestres. Uno de ellos, fue el realizado en Brasil por Horn y col., (2015). En este estudio identificaron los perfiles de resistencia antimicrobiana en enterobacterias aisladas de canarios (*Serinus canaria*). Las cepas aisladas presentaron mayor resistencia a las sulfonamidas, seguido de la ampicilina y la tetraciclina; además se identificó un 55% de cepas MDR.

A su vez, otra investigación realizada por Zhang y col., en el (2017), determinó el perfil de RAM en bacterias fecales aisladas de codornices (*Colinus virginianus*) en los EE. UU. Los mayores valores de CIM (Concentración Mínima Inhibitoria) para *E.coli* y *Enterococcus* fueron para aminoglucósidos, betalactámicos,

lincosamidas, entre otros; los investigadores concluyeron que la resistencia a los antimicrobianos sería menor a la reportada en aves domésticas, pero que sería importante realizar más investigaciones que determinen el origen de la RAM en estas aves (Zhang y col., 2017).

Por otra parte, Kutkowska y col., (2019), identificaron cepas de *Enterococcus* resistentes a la meticilina, a la vancomicina (VRE) y teicoplanina, un 22% de todos los aislados de *Staphylococcus aureus*, fueron también meticilino resistentes (SARM); genotípicamente, se determinó la presencia del gen *mecA* y *van*. Se concluyó que la presencia de estas resistencias, reflejarían la presencia de estas cepas en fuentes de alimento ambientales (Kutkowska y col., 2019).

Maksimović y col., (2021) determinaron por primera vez la presencia de un *Staphylococcus aureus* SARM en un canario doméstico (*Serinus canaria domestica*) y confirmaron la presencia del gen *mecA*. Pese a no tratarse de un ave silvestre, los autores indicaron que se deberían hacer más estudios en paseriformes, a fin de determinar el papel epidemiológico de esas aves como potenciales reservorios de RAM (Maksimović y col., 2021).

## **1.4. Las Islas Galápagos**

### **1.4.1. Archipiélago de Galápagos**

En 1934 el gobierno del Ecuador declaró al archipiélago de Galápagos, como parque nacional (Muñoz, 2015). Considerando el valor ecológico de las Islas, en 1959, se determinó que el 97% de la superficie terrestre sería declarada Parque Nacional, siendo así, la potestad del estado, la protección de su flora y fauna (PNG, 2022). Este archipiélago se encuentra ubicado aproximadamente 1000 Km de distancia de la costa del Ecuador continental y está conformado por 127 islas e islotes (UNESCO, 2022). Adicionalmente, Galápagos está rodeado por la reserva marina, la cual posee una extensión de 133000 Km<sup>2</sup>, siendo una de las más grandes a nivel mundial (UNESCO, 2022).

Las Islas Galápagos son consideradas únicas en el mundo, tanto por el endemismo de sus especies de flora y fauna, así como por las características únicas de su ecosistema en general (Muñoz, 2015). Este nicho ecológico conserva el 95% de su diversidad, previa la colonización humana (Tye y col., 2002); sin embargo, los asentamientos humanos han tenido su impacto sobre las Islas (Watson y col., 2010).

En este contexto, es importante mencionar que el 3% del archipiélago se encuentra habitado (UNESCO, 2022) y que anualmente es visitado por un alto número de turistas (Walsh y col., 2010). Sin embargo, el impacto de estos dos factores sobre las Islas, no están completamente elucidados (Overbey y col., 2015).

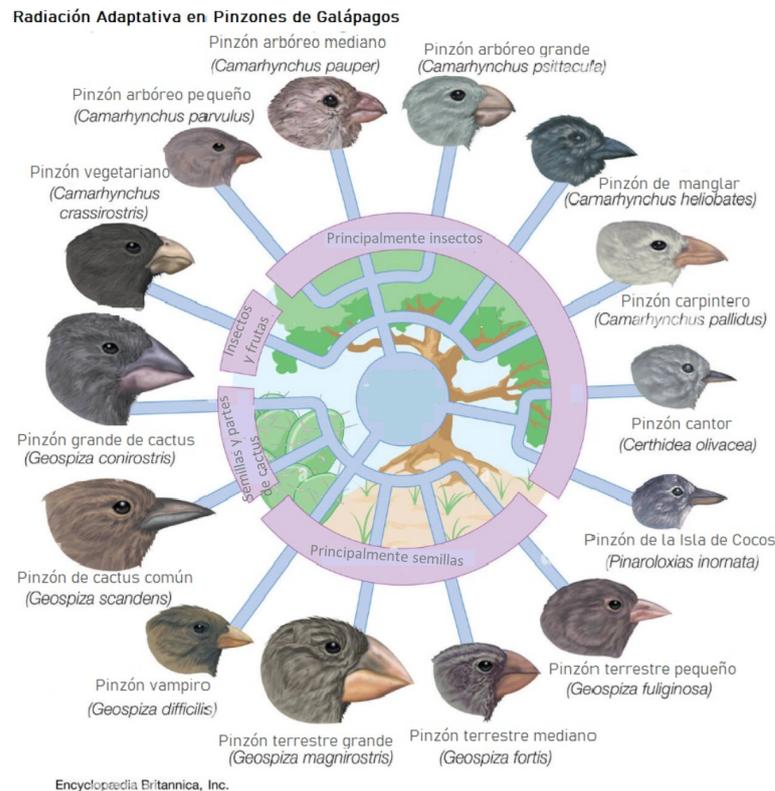
La Isla Santa Cruz, es la isla más poblada de archipiélago, con 15701 habitantes, de un total de 25244 que tiene la provincia de Galápagos (INEC, 2015) . Está distribuida en 3 centros poblacionales: Puerto Ayora que corresponde al área urbana y Bellavista y Santa Rosa que son zonas rurales (AME, 2011).

#### 1.4.2. Pinzones de Darwin

Los pinzones de Darwin, son aves paseriformes, que fueron estudiadas por Charles Darwin en su primera visita a las Islas Galápagos (Sato y col., 1999). Se han descrito 19 especies de pinzones de Darwin, 18 habitan en el archipiélago de Galápagos y una en la Isla de Cocos (Grant y Grant, 2014). Estas aves, se clasifican en 5 géneros, *Geospiza* (terrestres), *Camarhynchus* (arbóreas), *Platyspiza* (vegetariano), *Certhidia* (cantor) y *Pinaroloxias* (pinzón Isla de Cocos) (Grant and Grant, 2008; Skinner y col., 2014). El género *Geospiza*, se clasifica en 9 especies: *G. magnirostris*, *G. conirostris*, *G. fortis*, *G. scandens*, *G. fuliginosa*, *G. difficilis*, *G. acutirostris* y *G. septentrionalis* (Michel y col., 2018).

Esta aves han sido por mucho tiempo el tópico de diversos estudios basados en la biología de la evolución, desplazamiento de caracteres, hibridación, así como de radiación adaptativa (Skinner y col., 2014). La radiación adaptativa, considera dos componentes importantes, uno es el origen de nuevas especies, es decir la especiación, y la otra es la adaptación a diversos nichos ecológicos (Gavrilets y Losos, 2009). Este evento se centra en la oportunidad ecológica que encuentra una especie ancestral en un ambiente en el cual los recursos son abundantes y subutilizados (Gavrilets y Losos, 2009). La dieta ha sido reconocida como el principal factor de radiación adaptativa, ya que las diferentes especies han

desarrollado picos especializados (ver figura 3) a fin de poderse alimentar de los recursos que tienen disponibles (Grant y Grant, 2008; Michel y col., 2018).



**Figura 3.** Radiación Adaptativa en Pinzones de Darwin (Britania, 2022).

Los pinzones terrestres (*Geospiza* spp.) tienden a alimentarse de semillas, frutos y artrópodos, los pinzones arbóreos se alimentan de insectos, semillas, frutos, hojas y flores, y la especie vegetariana, posee una alimentación a base de vegetales (Grant y Grant, 2008). Un caso especial, es el del pinzón vampiro (*Geospiza septentrionalis*) que habita en las Islas de Darwin y Wolf, el cual se alimenta de huevos y sangre de piqueros de patas rojas (Michel y col., 2018).

### 1.4.3. Resistencia a los antimicrobianos en las Islas Galápagos

Algunas investigaciones realizadas en las Islas Galápagos, han identificado la presencia de bacterias resistentes a los antimicrobianos. Thaller y col., (2010), en un estudio realizado en aislados de iguanas terrestres (*Conolophus pallidus*) en la Isla Santa Fe, determinaron la ausencia de cepas de enterobacterias resistentes a antimicrobianos, con la excepción de dos aislados de *E. coli* (cepas no dominantes). Los investigadores concluyeron que sería rara la presencia de patrones de RAM, cuando tanto la exposición como el impacto antropogénico son mínimos en el área estudiada (Thaller y col., 2010).

Por otro lado, Franco y col., en el (2011) determinaron la presencia de *Salmonella* en iguanas terrestres (n=63) (*Colonophus subcristatus*) de la Isla Santa Cruz. Este estudio reportó que todos los aislados obtenidos eran susceptibles a los antimicrobianos (Franco y col., 2011a).

Wheeler y col., (2012) determinaron la presencia de RAM en cepas de *E.coli* y *Salmonella*, aisladas de heces de iguanas terrestres (*Conolophus* spp.), iguanas marinas (*Amblyrhynchus cristatus*), tortugas gigantes (*Geochelone nigra*) y agua de mar en las Islas Galápagos. Los resultados identificaron la presencia de RAM en aquellos reptiles que habitaban en dos sitios turísticos y en una muestra de agua de mar. Además, 18 (n=18/59) cepas de *E. coli* aisladas de 3 sitios cercanos a Puerto Baquerizo Moreno, mostraron resistencia fenotípica a la ampicilina, doxiciclina, tetraciclina y trimetoprima sulfametoxazol. Solo 5 cepas aisladas de *Salmonella enterica*, presentaron resistencia intermedia a la doxiciclina y tetraciclina. Los hallazgos del estudio sugieren un potencial riesgo de exposición a

bacterias de origen humano en reptiles en mayor proximidad con el hombre (Wheeler y col., 2012).

Overbey y col., (2015), caracterizaron el agua de 5 playas de la Isla San Cristóbal en Galápagos, con el objetivo de determinar el impacto antropogénico en aguas con y sin descarga residual. Se observó, que la concentración bacteriana excedía los parámetros de calidad internacional para *Enterococcus* en aguas recreacionales. También, se reportó una mayor RAM en cepas de *E. coli* en playas en contacto con aguas residuales. Los estudios indicaron que los drenajes contribuyen en el aumento de la resistencia a los antimicrobianos en el mar y sugieren un impacto humano en el resistoma ambiental de las Islas Galápagos (Overbey y col., 2015). En otro estudio realizado por Nieto y col., (2019), identificaron y realizaron la cuantificación de genes de resistencia a los antimicrobianos (GRA) en heces de 30 tortugas gigantes (*Chelonoidis porteri*) en la Isla Santa Cruz. Se analizó molecularmente un panel de 21 GRA diferentes, observando uno o más GRA en las muestras estudiadas. Además, el 35,7% de las tortugas presentaron un perfil multirresistente. Los investigadores indicaron que se deberían realizar más estudios, a fin de comprender de mejor manera los patrones de RAM y su implicación en las diferentes especies y regiones del archipiélago (Nieto y col., 2019).

Finalmente, Carillo y col., (2022), obtuvieron 20 aislados de *Salmonella enterica* de reptiles en la Isla San Cristóbal. Sin embargo, los aislados no presentaron resistencia a ninguno de los antimicrobianos analizados. Los científicos concluyeron, que sería importante entender, si esta ausencia de RAM se debe al

aislamiento genético de este género bacteriano en estos animales, o a la falta de contacto entre iguanas marinas y animales domésticos (Carrillo y col., 2022).

Pese a que algunas investigaciones, han determinado la presencia de RAM, en diferentes especies animales endémicas de las Islas Galápagos, ninguna hasta el momento se había realizado en aves silvestres. El objetivo de este trabajo es el de aportar información complementaria sobre la RAM, en pinzones de Darwin, distribuidos en tres zonas (urbana, agropecuaria y protegida), de la Isla Santa Cruz.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1. Hipótesis

- Las cepas aisladas de *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp. a partir de pinzones terrestres de tres diferentes zonas de la Isla Santa Cruz en Galápagos, presentan perfiles de resistencia para antimicrobianos de importancia crítica de la lista de la OMS.
- El nivel de resistencia a los antimicrobianos en las bacterias aisladas de pinzones se ve influenciado por el grado de impacto antropogénico.
- Existe una relación clonal de las cepas de *Escherichia coli* con perfiles de resistencia a antimicrobianos de pinzones terrestres en concordancia a la zona geográfica en la que habitan.

## 2.2. Objetivo general

- Identificar perfiles de resistencia a antimicrobianos clasificados por la OMS como de importancia crítica de máxima prioridad (betalactámicos, colistina y vancomicina) y muy importantes (tetraciclinas) en cepas de *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp., aislados de pinzones terrestres (*Geospiza* spp.) en tres regiones de la Isla Santa Cruz, en el archipiélago de Galápagos.

## 2.3. Objetivos específicos

- Aislar e identificar fenotípicamente a *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp. a partir de hisopados cloacales de pinzones terrestres de la Isla Santa Cruz.
- Determinar perfiles fenotípicos de resistencia a antibióticos sugeridos por la AGISAR/OMS (Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance), tales como gentamicina, cloranfenicol, cefotaxima, cefepima, cefoxitina, azitromicina, ampicilina, amoxicilina, ciprofloxacina, trimetoprima sulfametoxazol y tetraciclina en *Escherichia coli*; y gentamicina, estreptomina, cloranfenicol, vancomicina, eritromicina, ampicilina, ciprofloxacina y tetraciclina en *Enterococcus* spp., aislados de hisopados cloacales de pinzones terrestres en la Isla Santa Cruz.
- Identificar genes de resistencia a antibióticos betalactámicos (genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> y *bla*<sub>CMY</sub>), colistina (*mcr*-1, 2, 3, 4 y 5) y tetraciclina (*tetA*) en cepas de *Escherichia coli* aisladas, y de vancomicina (*vanA*), y tetraciclina (*tetM*) en cepas aisladas de *Enterococcus* spp.

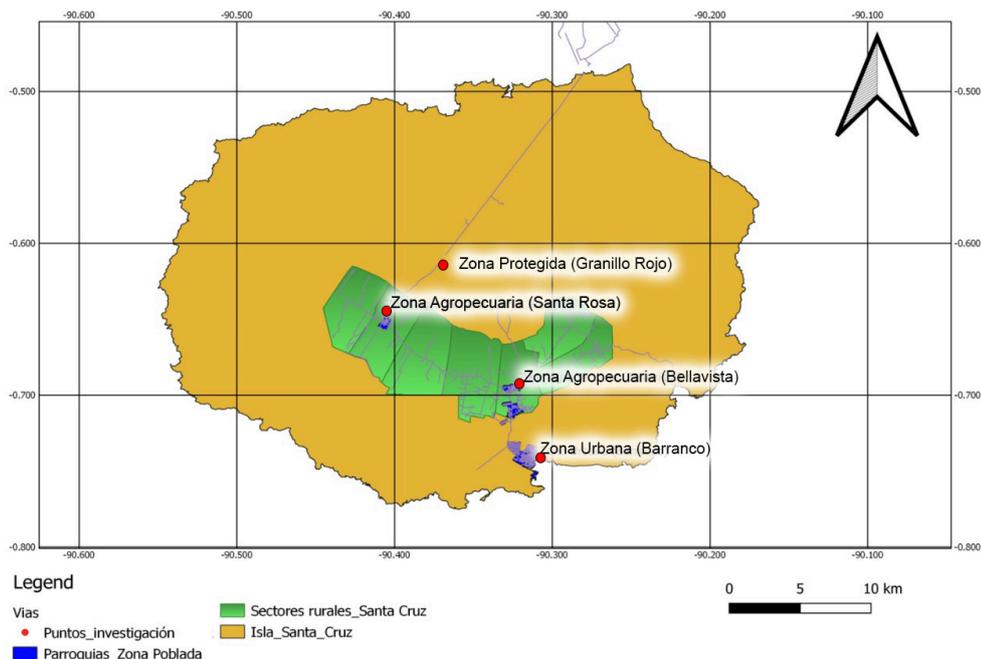
### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

El presente estudio contó con el permiso de investigación científica No PC 85-18 emitido por la Dirección del Parque Nacional Galápagos y la Dirección de Gestión Ambiental.

El componente molecular de la investigación contó con el permiso a acceso a recursos genéticos No PC - 45-19, contrato marco MAE-DNB-CM-2028-0094, emitido por el Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica del Gobierno del Ecuador.

#### **3.1. Muestreo y transporte de muestras**

El muestreo de pinzones terrestres de Darwin (*Geospiza* spp.), se lo realizó en la Isla Santa Cruz en Galápagos y fue aleatorio simple estratificado por zonas. Los puntos de colección de muestras fueron: zona urbana (0°44' 29"S/ 90°18'28"O), zona agropecuaria (0°41' 34"S/ 90°19'16"O y 0°38' 41"S/ 90°24'19"O) y zona protegida (0°36'56.3"S/ 90°22'06.8"O) (ver figura 4).



**Figura 4.** Puntos de colección de muestras en la Isla Santa Cruz, Galápagos (fuente: ABG)

El cálculo del tamaño de muestra se lo realizó en base a una población infinita con un IC del 95% y un error del 0,5% ( $n= 384,16$ ). Se muestrearon un total de 128 pinzones ( $n= 128$ ) en cada una de las zonas, es decir 1/3 de la población total calculada en cada área seleccionada, durante los meses de marzo a agosto de 2019. Se realizó un esquema de colecta semanal, de manera tal, que todas las zonas fueran muestreadas durante el mismo mes.

Las aves fueron capturadas mediante la utilización de redes neblina de nylon de dimensión estándar (ver figura 5), con una longitud de 12 m (75 denier / 3 ply) (Smith y col., 1999). Estas fueron dispuestas en los puntos de muestreo entre las 5:00 y 5:30 a.m., debido a la mayor actividad que presentan las aves durante las primeras horas del día (Smith y col., 1999); se mantuvo la red durante 4 a 6 horas en el día (Ralph y col., 2001)



**Figura 5.** Instalación de red neblina en diferentes puntos de muestreo

Se manipuló individualmente a las aves para la toma de la muestra (ver figura 6), la cual consistió en un hisopado cloacal (previa impregnación del hisopo estéril en caldo) y posteriormente sumergido en un tubo estéril con 700  $\mu$ l caldo BHI (Brain Heart Infusion Broth; Becton, Dickinson and Company; Sparks, Maryland, USA)



**Figura 6.** Hisopado cloacal en pinzones terrestres de la Isla Santa Cruz

Una vez colectada la muestra, las aves fueron marcadas en la pata izquierda con un anillo de color (Foti y col., 2017) y posteriormente fueron liberadas. Se utilizó diferente color de anillo por zona de muestreo (ver figura 7).



**Figura 7.** Marcaje de los pinzones con anillos de diferente color para cada zona

Posteriormente, las muestras fueron transportadas a 4°C a los laboratorios de la Agencia de Regulación y Control de la Bioseguridad y Cuarentena para Galápagos (ABG); el hisopo fue retirado mediante el uso de una pinza estéril y las muestras fueron incubadas a 37°C por 24 horas. Al día siguiente, se añadió el 20% de glicerol (140 µl) y se procedió a congelar las muestras a -20 °C, para su posterior traslado y análisis, en los laboratorios de Bacteriología y Micología y a la Unidad de Enfermedades Transmitidas por Alimentos y Resistencia a los Antimicrobianos (UNIETAR) de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Central del Ecuador.

### **3.2. Aislamiento e identificación de cepas centinela en pinzones de Darwin (*Geospiza* spp.)**

#### **3.2.1. Aislamiento de *Escherichia coli***

Previo a realizar el aislamiento de *Escherichia coli*, las muestras fueron enriquecidas en 10 ml de caldo BHI e incubadas a 37 °C por 24 horas (Hasan y col., 2016). Posteriormente, se sembró mediante la técnica de agotamiento por estriación, en el medio selectivo y diferencial para enterobacterias, agar Levine EMB (Becton Dickinson, Heidelberg/Germany); las muestras se incubaron a 37 °C por 48 horas. Se escogieron dos colonias compatibles con *E. coli* (colonias azul negro con verde metalizado), confirmando su identificación a través de pruebas bioquímicas.

### **3.2.2. Identificación bioquímica de *Escherichia coli***

Las 2 colonias compatibles con *E. coli* en el medio selectivo, fueron aisladas en agar nutritivo (Becton, Dickinson, Sparks, Maryland, USA). La identificación bioquímica de la bacteria se realizó de una batería que constó de 5 pruebas (ver Anexo 1): agar triple azúcar hierro o TSI (Becton Dickinson, Heidelberg/Germany); medio de sulfuro indol para movilidad o SIM (Sulfide, Indol, Motility; Becton, Dickinson, Sparks, Maryland, USA); agar lisina hierro o LIA (Lysine Iron Agar; Becton, Dickinson, Sparks, Maryland, USA); agar citrato de Simmons (Becton, Dickinson, Sparks, Maryland, USA); y caldo urea (Becton, Dickinson, Sparks, Maryland, USA). Todas aquellas cepas de *E. coli* identificadas bioquímicamente y que amplificaron para alguno de los genes en estudio, fueron reconfirmadas mediante espectrometría de masa por la técnica de MALDI-TOF MS.

### **3.2.3. Aislamiento de *Enterococcus* spp.**

Previo a realizar el aislamiento de *Enterococcus* spp., las muestras fueron

enriquecidas en 10 ml de caldo BHI e incubadas a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, se sembró mediante la técnica de agotamiento por estriación, en el medio selectivo y diferencial CHROMagar Orientation (Becton Dickinson, Heidelberg/Germany) y las muestras fueron incubadas a 37 °C por 48 horas. Posteriormente, se escogieron 2 colonias compatibles con *Enterococcus* spp. (colonias pequeñas de color verde azulado/turquesa), a fin de realizar la identificación bioquímica de las colonias.

#### **3.2.4. Identificación bioquímica de *Enterococcus* spp.**

La identificación bioquímica de *Enterococcus* spp. fue estandarizada en base a lo descrito por Lopardo (2016). A fin de contar con cultivo puro de las colonias fenotípicamente compatibles con *Enterococcus*, estas se sembraron nuevamente en CHROMagar Orientation, y fueron incubadas a 37 °C por 24 horas. Posteriormente se realizó la tinción Gram de las 2 colonias y se incluyó en el estudio a aquellas que correspondieron a cocos grampositivos.

Las colonias de cocos grampositivos fueron sembradas en agar sangre de cordero e incubadas 37 °C por 24 horas, con el objetivo de continuar con el proceso de tipificación de las mismas. Para la caracterización de las colonias aisladas, se realizó la prueba de hidrólisis de la esculina en agar Bilis Esculina (Becton, Dickinson, Sparks, Maryland, USA), las cuales fueron incubadas 37 °C por 24 horas.

Aquellas colonias que fueron positivas (color verde oliva a negro) se re aislaron en agar sangre de cordero e incubadas 37 °C por 24 horas, y se les realizó las pruebas confirmatorias para la determinación de las enzimas

pirrolidonilarilamidasa (PYR) y leucino aminopeptidasa (LAP). Finalmente se realizó la prueba de cloruro de sodio al 6,5% (ver Anexo 1).

Para la realización de la prueba en disco, se tomó de una a dos colonias aisladas previamente en agar sangre de cordero, y se suspendieron en 50 µl de cloruro de sodio estéril al 0,9% contenidos en tubos Eppendorf®. A continuación se colocó el disco de PYR y se incubó a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos; finalmente, se reveló la prueba colocando 2 gotas de cinamaldehído, y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente (Britania, 2020a). Las cepas positivas a la presencia de la enzima tornaron de color rosado-rojizo, y continuaron en el estudio.

A las cepas que dieron positivas a la prueba de PYR, se les realizó la prueba para determinación de la enzima leucino aminopeptidasa (LAP; Laboratorio Britania, Buenos Aires, Argentina). El procedimiento fue similar al de PYR, pero utilizando los discos de LAP (Britania, 2020). Una reacción positiva se evidencia cuando la reacción torna a un color rosado rojo.

Finalmente, se realizó la prueba de Cloruro de Sodio (NaCl) al 6,5%. Las cepas bacterianas aisladas, fueron previamente sembradas en caldo BHI e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Al día siguiente, se colocó 200 µl de Cloruro de Sodio al 6.5% estéril más 80 µl del cultivo, en un pocillo de una microplaca y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Además, se colocaron 2 controles negativos, los cuales consistieron en NaCl al 6.5% más caldo BHI estéril. Se observó turbidez (crecimiento) en las cepas positivas o tolerantes.

Cabe destacar que las cepas de *Enterococcus* spp. fenotípicamente identificadas a través de baterías bioquímicas, fueron reconfirmadas por MALDI TOF MS.

### **3.2.5. Conservación de cepas aisladas de *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp.**

Las cepas aisladas correspondientes a *E. coli* y *Enterococcus* spp., fueron criopresevadas a -80 °C en caldo BHI más 20% de glicerol.

### **3.2.6. Determinación fenotípica de perfiles de resistencia a los antimicrobianos en cepas Centinela en pinzones de Darwin (*Geospiza* spp.) por el método de difusión en disco (Kirby Bauer)**

El perfil fenotípico de resistencia a los antimicrobianos se efectuó por el método de Kirby Bauer descrito por Hudzicki (2009). Los antibiogramas se realizaron de acuerdo con el protocolo estandarizado, en cajas Petri de 150 x 15 mm, donde se colocó 60 ml de agar Mueller Hinton (Becton Dickinson, Heidelberg/Germany). Las cepas fueron sembradas previamente en agar nutritivo para *E. coli* y agar sangre para *Enterococcus*, e incubadas a 37 °C por 24 horas. De acuerdo a lo descrito, se inocularon de 4 a 5 colonias en solución salina estéril al 0,9%, hasta ajustar la suspensión a 0,5 en la escala de McFarland (Hudzicki, 2009). A continuación, se inoculó y estrió la cepa a analizar mediante la utilización de un hisopo estéril, siguiendo las recomendaciones del protocolo; finalmente, se colocaron los discos de los antimicrobianos a analizar (WHO / AGISAR, 2017).

Cabe destacar que se realizó el control de viales de antibióticos (Hudzicki, 2009) utilizando para los antibiogramas de *E.coli*, la cepa de *E.coli* ATCC 25922 y la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Para los análisis en *Enterococcus* spp., el control de viales se realizó con la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y con la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (CLSI, 2019).

Los puntos de corte utilizados para la interpretación de resultados, fueron los indicados en el manual M100 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, 2019).

### **3.2.7. Determinación fenotípica de perfiles de resistencia a los antimicrobianos en cepas de *Escherichia coli***

Los antimicrobianos utilizados fueron los de importancia para enterobacterias, de acuerdo con lo recomendado por la AGISAR-OMS (WHO / AGISAR, 2017); ampicilina (10 µg), ciprofloxacina de (5 µg), cefoxitina (30 µg), cefotaxima (30 µg), cefepime (30 µg), gentamicina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), tetraciclina (30 µg) y trimetoprima más sulfametoxazol (23,57/1,25 µg) (Becton, Dickinson, Sparks, Maryland, USA). Los datos obtenidos fueron almacenados en una base de datos en Microsoft Excel®.

### **3.2.8. Determinación fenotípica de perfiles de resistencia a los antimicrobianos en cepas de *Enterococcus spp.***

Los antimicrobianos analizados fueron los de importancia para *Enterococcus*, de acuerdo con lo recomendado por la AGISAR-OMS (WHO / AGISAR, 2017),, estos fueron: ampicilina (10 µg), gentamicina (120 µg), cloranfenicol (30 µg), tetraciclina (30 µg), vancomicina (30 µg), estreptomina (300 µg), teicoplanina (30 µg) y ciprofloxacina (5 µg) (Becton, Dickinson, Sparks, Maryland, USA). Los datos obtenidos fueron almacenados en una base de datos en Microsoft Excel®.

### **3.3. Determinación genotípica de perfiles de resistencia a los antimicrobianos en cepas centinela en pinzones de Darwin (*Geospiza* spp.)**

Mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se realizó la determinación de los genes de resistencia antimicrobianos de importancia crítica en cepas centinela de RAM (*E. coli* y *Enterococcus* spp.) aislados de pinzones terrestres de Darwin. Estos fueron en *E. coli*: genes de resistencia a antibióticos betalactámicos (genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> y *bla*<sub>CMY</sub>); gen de resistencia a la tetraciclina (*tetA*); y genes de resistencia a la colistina (*mcr*-1, 2, 3, 4 y 5). En *Enterococcus*, se determinó el gen de resistencia a la vancomicina (*vanA*) y el gen de resistencia a la tetraciclina (*tetM*). Los protocolos se describen a continuación.

#### **3.3.1. Extracción de ácidos nucleicos en cepas aisladas de *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp.:**

Se realizó la extracción de ADN de las cepas aisladas de *E. coli* y *Enterococcus* spp., mediante la técnica modificada de lisis por ebullición descrita por (Millar y col., 2000). Las cepas fueron cultivadas en agar nutritivo (*E. coli*) y agar sangre (*Enterococcus*) e incubadas a 37 °C por 24 horas. Para la extracción del material genético, se tomaron de 2 a 3 colonias del cultivo, con un asa calibrada estéril de 1 µL; las colonias fueron suspendidas y homogenizadas en 300 µL de buffer TE 1X (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA). Posteriormente, las suspensiones fueron colocadas en un termobloque a 95 °C por 20 minutos. A continuación, se centrifugó a 13 300 r.p.m. durante 3 minutos, y se colocó el sobrenadante

mediante el uso de una micropipeta, en un tubo eppendorf ® nuevo. El material genético fue almacenado a -20 °C.

### **3.3.2. Determinación de genes de resistencia de antimicrobianos de importancia crítica en cepas de *Escherichia coli***

Se realizó la determinación genotípica de resistencia a los antimicrobianos por PCR convencional de *E. coli* aisladas de pinzones terrestres de Darwin. Se determinó la presencia de genes que codifican para betalactamasas, tetraciclina y colistina, como se describen a continuación.

#### **3.3.2.1. Identificación de genes de betalactamas (*bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CMY</sub>)**

En cepas de *E. coli* con perfil fenotípico de resistencia a los betalactámicos (cefotaxima y ampicilina), se analizó la presencia de los genes de resistencia que codifican para betalactamasas. La betalactamasa CTX-M general (*bla*<sub>CTX-M</sub>), se realizó de acuerdo al protocolo descrito por (Hasman y col., 2005). Los genes que codifican para las betalactamasas TEM (*bla*<sub>TEM</sub>), SHV (*bla*<sub>SHV</sub>) y CMY (*bla*<sub>CMY</sub>) se realizaron de acuerdo con el protocolo descrito por Dierikx y col., (2010).

La secuencia de los primers utilizados, así como las condiciones de la PCR y concentraciones del Master Mix (Promega, Madison, Wiconsin, USA) se encuentran descritas en la sección de anexos (ver Anexo 2).

Las reacciones de PCR se trabajaron a un volumen final de 15 µl y los amplicones fueron visualizados en un gel de agarosa (Promega, Madison, Wiconsin, USA) al 1.5% teñido con SYBR safe (Invitrogen, Paisley, UK) en relación de 1 µl/10 ml

de TBE 0.5X.

Los fragmentos amplificados fueron de: 593 pb (*bla*<sub>CTX-M</sub>), 964 pb (*bla*<sub>TEM</sub>), 795 pb (*bla*<sub>SHV</sub>) y 1117 pb (*bla*<sub>CMY</sub>).

### **3.3.2.2. Identificación de gen de resistencia a la tetraciclina (*tetA*)**

El gen de resistencia a la tetraciclina, *tetA*, fue determinado de acuerdo al protocolo descrito por Pantozzi(2018). La secuencia de los primers utilizados, así como las condiciones de la PCR y la concentración del Master Mix se encuentran descritas en la sección de anexos (ver Anexo 2).

La reacción de PCR se trabajó a un volumen final de 15 µl y el fragmento amplificado fue visualizados en un gel de agarosa al 1.5% teñido con SYBR safe (SYBR Safe DNA Gel Stain) en relación de 1 µl/10 ml de TBE 0.5

### **3.3.2.3. Identificación de gen de resistencia a la colistina (*mcr-1* a 5)**

La Multiplex-PCR para la amplificación de los genes de resistencia a la colistina (*mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* y *mcr-5*), fue realizado de acuerdo a lo descrito por (Rebelo y col., 2018). La secuencia de los primers utilizados, así como las condiciones de la PCR y la concentración del Master Mix se encuentran descritas en la sección de anexos (ver Anexo 2).

La reacción de PCR se trabajó a un volumen final de 15 µl y el fragmento amplificado fue visualizado en un gel de agarosa al 1.5% teñido con SYBR safe

(SYBR Safe DNA Gel Stain) en relación de 1  $\mu$ l/10 ml de TBE 0.5X.

### **3.3.3. Determinación de genes de resistencia de importancia crítica en cepas de *Enterococcus* spp.**

#### **3.3.3.1. Identificación de gen de resistencia a la vancomicina (*vanA*)**

La identificación del gen *vanA* que codifica para la resistencia a la vancomicina, fue realizada de acuerdo a lo descrito por (Dutka y col., 1995). La secuencia de los primers utilizados, las condiciones de la PCR y la concentración del Master Mix se encuentran descritas en la sección de anexos (ver Anexo 3).

La reacción de PCR se trabajó a un volumen final de 15  $\mu$ l y el fragmento amplificado fue visualizado en un gel de agarosa al 1.5% teñido con SYBR safe (SYBR Safe DNA Gel Stain) en relación de 1  $\mu$ l/10 ml de TBE 0.5X.

#### **3.3.3.2. Identificación de gen de resistencia a la tetraciclina (*tetM*)**

El gen de resistencia a la tetraciclina, *tetM*, fue determinado mediante la PCR descrita por Cochetti y col., (2005). La secuencia de los primers utilizados, las condiciones de la PCR y la concentración del Master Mix se encuentran descritas en la sección de anexos (ver Anexo 3).

La reacción de PCR se trabajó a un volumen final de 15  $\mu$ l y el fragmento amplificado fue visualizado en un gel de agarosa al 1,5% teñido con SYBR safe (SYBR Safe DNA Gel Stain) en relación de 1  $\mu$ l/10 ml de TBE 0.5X.

### **3.4. Genotipificación de aislados de *Escherichia coli* mediante Electroforesis en Gel de Campo Pulsado.**

La Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE), es una técnica utilizada para la diferenciación genotípica entre aislados bacterianos del mismo tipo. Esta metodología se utilizó para la determinación de clonalidad entre 22 cepas de *E. coli*, aisladas de tres zonas (urbana, agropecuaria y protegida)) de la Isla. El criterio de inclusión de las cepas fue que dentro de los meses de mayo a agosto del 2019 compartieran un perfil similar de resistencia antimicrobiana entre zonas muestreadas (ver tabla 2)

**Tabla 2.** Parámetros de Inclusión de Cepas de *Escherichia coli* analizadas por la técnica de PFGE.

Mes de Toma de Muestra	Código Muestra	Zona de la Muestra	Perfl Fenotípico de Resistencia Antimicrobiana
Mayo	PTMB051a	Urbana	Sensible
Junio	PTMB070a	Urbana	A+F
Junio	PTMB072b	Urbana	T+SXT
Julio	PTMB098a	Urbana	A+F
Julio	PTMB102a	Urbana	Sensible
Agosto	PTMB128a	Urbana	T+SXT+C
Agosto	PTMB130a	Urbana	Sensible
Mayo	PTMBe021b	Agropecuaria	A+F
Junio	PTMBe038a	Agropecuaria	T+SXT+C
Junio	PTMBe050c	Agropecuaria	Sensible
Junio	PTMBe051a	Agropecuaria	Sensible
Julio	PTMBe065b	Agropecuaria	Sensible
Julio	PTMBe090b	Agropecuaria	A+F
Agosto	PTMBe118a	Agropecuaria	Sensible
Agosto	PTMBe118b	Agropecuaria	T+SXT
Mayo	PTMK022a	Protegida	A+F
Mayo	PTMK027a	Protegida	Sensible
Junio	PTMK032a	Protegida	A+T
Julio	PTMK053b	Protegida	A+F
Julio	PTMK062a	Protegida	Sensible
Agosto	PTMK117b	Protegida	A+F
Agosto	PTMK120b	Protegida	Sensible

A: Ampicilina, F: Cefoxitina, T: Tetraciclina, SXT: Trimetoprima Sulfametoxazol, CL: Cloranfenicol.

El protocolo utilizado fue el descrito por la Red Pulsenet para “*Escherichia coli* O157:H7, *E.coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotipos, *Shigella sonnei* y *Shigella flexneri*” (Centers for Disease Control and Prevention., 2017).

En síntesis, las cepas de *E. coli* seleccionadas, fueron cultivadas en agar tripticasa de soya (BD Tryptic Soy Agar) por 24 horas a 37°C; al día siguiente se realizó la suspensión celular. Las células bacterianas fueron mezcladas en agarosa de bajo punto de fusión al 1% (SeaKem® Gold Agarose / SKG) con el objetivo de hacer los moldes o *plugs*. Posteriormente, las células fueron lisadas a fin de que el ADN quede libre dentro del *plug* utilizando buffer de lisis celular (50 mM Tris:50 mM EDTA, pH 8.0 + 1% Sarcosil) y la enzima Proteinasa K (Promega); la digestión

de ADN se hizo con la enzima de restricción *XbaI* (Promega) 50 U/ muestra. La separación de los fragmentos en campo pulsado, se corrieron en un gel de agarosa SKG al 1% con un sistema CHEF-DR III (CHEF-DR III Variable Angle System Biorad).

Las condiciones de electroforesis fueron: tiempo de conmutación inicial de 6.76 segundos, tiempo de conmutación final de 35.38 segundos, voltaje de 6V de 17 a 20 horas. Finalmente, se tiñó el gel con bromuro de etidio en proporción de 10mg/ml (solución de 500 ml de agua ultrapura) durante 60 a 90 minutos (al menos 3 cambios de solución cada 20 minutos aproximadamente. Se visualizó mediante luz UV.

El control utilizado como marcador de peso molecular fue *Salmonella* serovar Braenderup H9812.

#### **3.4.1. Análisis Clonalidad**

El análisis de los resultados de la PFGE se realizó utilizando el programa Bionumerics versión 8.0. Se generaron 4 dendrogramas, 1 de cada zona (urbana, agropecuaria y protegida) y otro de las tres zonas juntas. El método de agrupamiento utilizado en los dendrogramas fue UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) con una tolerancia del 1%.

#### **3.5. Análisis Estadístico**

El análisis estadístico de los datos correspondientes a la proporción de cepas de bacterias centinela aisladas y la asociación entre perfil fenotípico de resistencia y las tres zonas muestreadas, se realizó mediante la prueba de Chi cuadrado para

diferencia de proporciones. Se consideró como significativo un valor de  $p \leq 0,05$ , con un nivel de confianza (CI) del 95%. Se utilizó el programa estadístico on line WinEpi © (2006).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Aislamiento e identificación de cepas centinela en pinzones de Darwin (*Geospiza spp.*)

De un total de 384 muestras colectadas (n=384), se aislaron 136 cepas de *E. coli* y 332 cepas de *Enterococcus spp.*

La distribución de los aislamientos de bacterias indicadoras según la zona se expresa en la tabla 3. Las proporciones de los aislamientos de *E. coli* y *Enterococcus spp.*, se asociaron a la zona de muestreo ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 3.** Número y Porcentaje de Cepas Centinela Aisladas de Pinzones (*Geospiza spp.*) de acuerdo con la Zona de Muestreo en la Isla Santa Cruz.

Bacterias indicadoras	Zonas muestreadas			Total Cepas Aisladas	P (< 0,05)
	Zona Urbana	Zona Agropecuaria	Zona Protegida		
	n (%)	n (%)	n (%)		
<i>Escherichia coli</i>	26 (19%)	64 (47%)	46(34%)	136	0,0001
<i>Enterococcus spp.</i>	135(41%)	114 (34%)	83(25%)	332	0,0001

En la etapa de identificación bacteriana se registró un número notable de cepas de *Enterobacter spp.* (n= 206). Pese a no estar considerado en el estudio, se lo valoró por su frecuencia de aislamiento como una posible especie centinela dentro de los bacilos gramnegativos. Es así que, el 44% (n= 90/206) de las cepas correspondieron a la zona urbana, 27% (n= 55/206) a la zona agropecuaria y el 30% (n= 61/206) a la zona protegida de la Isla Santa Cruz.

Finalmente se determinó la existencia de una diferencia de proporciones ( $p < 0,0001$ ) entre los aislamientos de las cepas centinela en este estudio. El género *Enterococcus* spp. fue aislado en mayor porcentaje que *E. coli* y *Enterobacter* spp. ( $p < 0,0001$ ), y *Enterobacter* spp. fue aislado en mayor porcentaje que *E. coli* ( $p < 0,0001$ ).

El porcentaje de aislamiento de cada cepa bacteriana, varió de acuerdo con la zona de muestreo (ver tabla 4).

**Tabla 4.** Diferencia de proporciones ( $p \leq 0,05$ ) de Cepas Centinela Aisladas de Pinzones (*Geospiza* spp.) de acuerdo con la Zona de Muestreo en la Isla Santa Cruz.

Bacterias indicadoras	Zonas muestreadas			Total Muestras n	P (<0,05) P
	Zona Urbana %	Zona Agropecuaria %	Zona Protegida %		
<i>Escherichia coli</i>	19,12%	47,10%	33,80%	128	0,0001
<i>Enterococcus</i> spp.	40,70%	34,30%	25,00%	128	0,0280
<i>Enterobacter</i> spp.	43,70%	26,70%	29,60%	128	0,0086

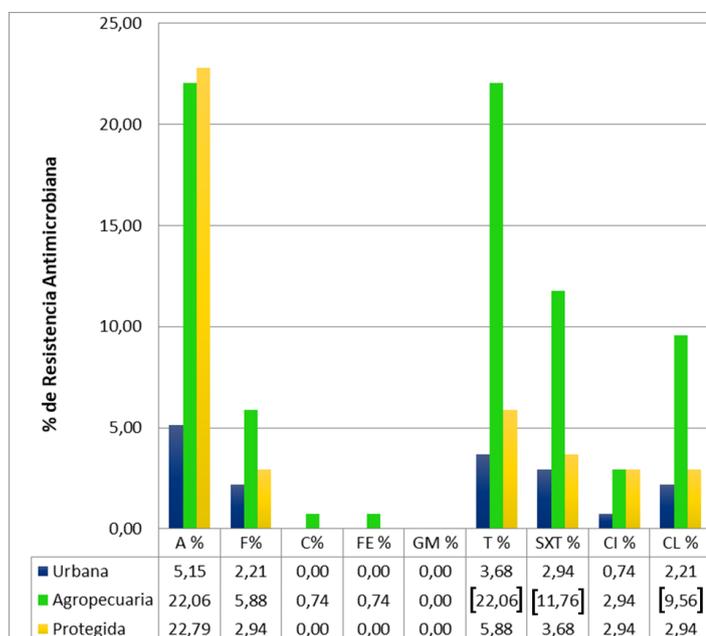
## 4.2. Determinación de resistencia a los antimicrobianos.

### 4.2.1. Determinación fenotípica y perfiles de resistencia a los antimicrobianos en *Escherichia coli*

Se determinó fenotípicamente la resistencia a los antimicrobianos (WHO / AGISAR, 2017) de 136 cepas aisladas de *E. coli*. Se identificó una resistencia del 50% ( $n = 68/136$ ) a la ampicilina, 31,6% ( $n = 43/136$ ) a tetraciclina, 18,4% ( $n = 25/136$ ) a trimetoprima sulfametoxazol, 14,7% ( $n = 20/136$ ) a cloranfenicol, 11,1% ( $n = 15/136$ ) a la cefoxitina, 6,6% ( $n = 9/136$ ) a ciprofloxacina 0,7% ( $n = 1/136$ ) a cefotaxima, 0,7% a cefepime ( $1/136$ ) y 0% ( $n = 0/136$ ) a gentamicina. A su vez, se

determinó la resistencia por zonas muestreadas de la Isla (ver figura 8). Se determinó la asociación entre la RAM y las tres zonas muestreadas ( $p < 0,05$ ) (Anexo 4). Los antimicrobianos que mostraron una diferencia estadísticamente significativa, fueron ampicilina ( $p < 0,0001$ ), tetraciclina ( $p < 0,0001$ ), trimetoprima sulfametoxazol ( $p < 0,0035$ ) y cloranfenicol ( $p < 0,0084$ ).

En este contexto, se observó la misma proporción de resistencia a la ampicilina entre la zona agropecuaria y protegida de la Isla ( $p < 0,500$ ). Con respecto a la tetraciclina, trimetoprima sulfametoxazol y cloranfenicol, estas mostraron una proporción significativamente mayor ( $p < 0,0001$ ) en la zona agropecuaria.



A: Ampicilina, F: Cefoxitina, C: Cefotaxima, FE: Cefepime, GM: Gentamicina, T: Tetraciclina, SXT: Trimetoprima Sulfametoxazol, CI: Ciprofloxacina, CL: Cloranfenicol.

**Figura 8.** Proporción de RAM en cepas de *Escherichia coli* aisladas de las zonas urbana, agropecuaria y protegida de la Isla Santa Cruz.

Se identificaron 26 cepas de *E.coli* multiresistentes (MDR), es decir resistentes a tres o más clases de antimicrobianos (CDC, 2019). El 3,84% (n= 1/26) de las cepas presentó un perfil de resistencia para ocho antimicrobianos, el 11,5% (n= 3/26) para cinco antimicrobianos, el 50% (n= 13/26) para cuatro antimicrobianos y el 34,6% (n= 9/26) presentó resistencia para tres antimicrobianos diferentes.

Los perfiles de resistencia a los antimicrobianos en las cepas aisladas de *E. coli*, se presentan en la tabla 5.

**Tabla 5.** Perfil Fenotípico de Resistencia Antimicrobiana en Cepas de *Escherichia coli* aisladas de Pinzones (*Geospiza* spp.)

Perfil	Número Antibióticos	Número de Cepas con el Perfil	Multirresistencia (MDR)
A+F+C+FE+T+SXT+CI+CL	8	1	1
A+F+T+SXT+CL	5	1	1
A+F+T+SXT+CI	5	1	1
A+T+SXT+CI+CL	5	1	1
A+F+T+CL	4	2	2
A+T+SXT+CIP	4	3	3
A+T+SXT+CL	4	6	6
A+T+CIP+CL	4	1	1
T+SXT+CI+CL	4	1	1
A+F+T	3	2	2
A+T+SXT	3	2	2
A+T+CL	3	1	1
A+SXT+CI	3	1	1

T+SXT+CL	3	3	3
A+F	2	8	0
A+T	2	7	0
A+SXT	2	3	0
A+CI	2	1	0
A+CL	2	1	0
T+SXT	2	2	0
A	1	26	0
T	1	9	0
CI	1	2	0
SENSIBLES	0	51	0

A: Ampicilina, F: Cefoxitina, C: Cefotaxima, FE: Cefepime, T: Tetraciclina, SXT: Trimetoprima Sulfametoxazol, CI: Ciprofloxacina, CL: Cloranfenicol.

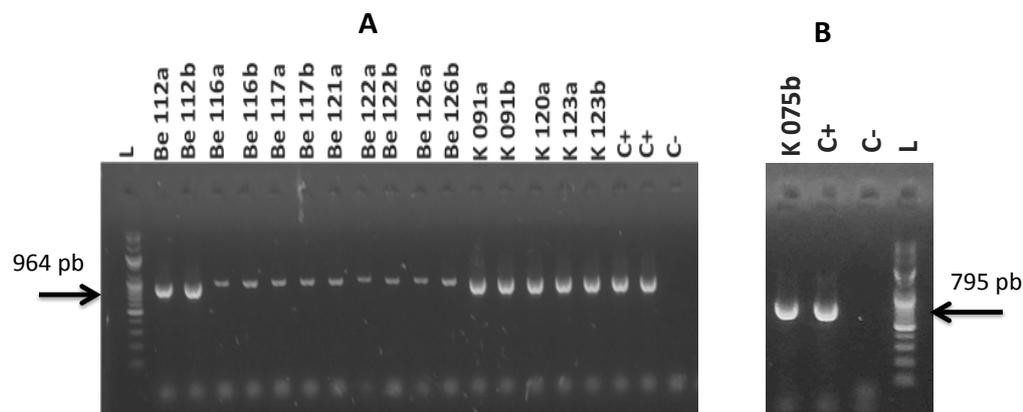
#### 4.2.2. Determinación de genes de resistencia a los antimicrobianos de importancia crítica en *Escherichia coli*

##### 4.2.2.1. Identificación de genes de betalactamas (*bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CMY</sub>)

Se identificaron los genes que codifican para betalactamasas, de acuerdo con los parámetros de inclusión fenotípicos de resistencia. En este sentido, no se identificó el gen *bla*<sub>CTX-M</sub> en la cepa de *E. coli* (n= 1/136) con resistencia fenotípica a la cefotaxima.

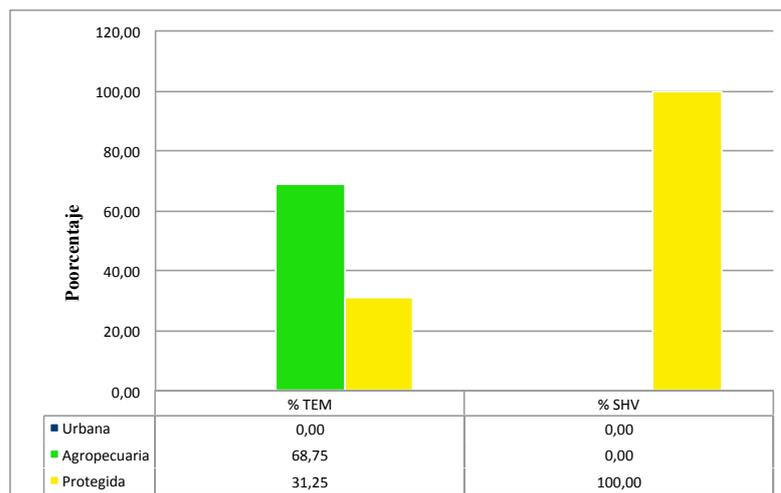
Por otro lado, se identificó el gen *bla*<sub>TEM</sub> en el 23,5% (n=16/68) de las cepas de *E. coli*, el gen *bla*<sub>SHV</sub> en 1,5% (n=1/68) de la cepa de *E. coli*, y no se identificó el gen

*bla*<sub>CMY</sub> (n= 0/68) (ver Figura 9).



**Figura 9.** Producto de amplificación del gen *bla*<sub>TEM</sub> (A) y gen *bla*<sub>SHV</sub> (B) en las zonas agropecuaria (Be) y protegida (K) de la Isla Santa Cruz; control positivo (C+), control negativo (C-), marcador de peso molecular (L).

Se diferenció el porcentaje de amplificación de los genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CMY</sub>, en las diferentes zonas muestreadas (ver figura 7). El gen que codifica para la betalactamasa *bla*<sub>TEM</sub> se identificó en cepas de *E. coli* (n= 11/16) correspondientes a la zona agropecuaria y cepas de *E. coli* (n= 5/ 16) de la zona protegida de la Isla; el gen *bla*<sub>SHV</sub> solo se identificó en la zona protegida (n= 1/1); ver porcentajes en la figura 10.

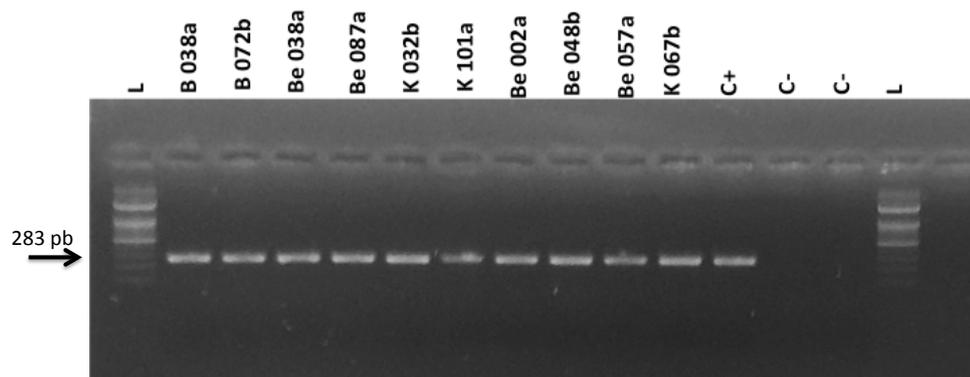


**Figura 10.** Proporción de cepas de *Escherichia coli* fenotípicamente resistentes a la ampicilina en las que se identificaron los genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> en las zonas agropecuaria y protegida de la Isla Santa Cruz.

En las cepas de *E. coli* de la zona urbana no se identificaron genes de betalactamasas de espectro extendido.

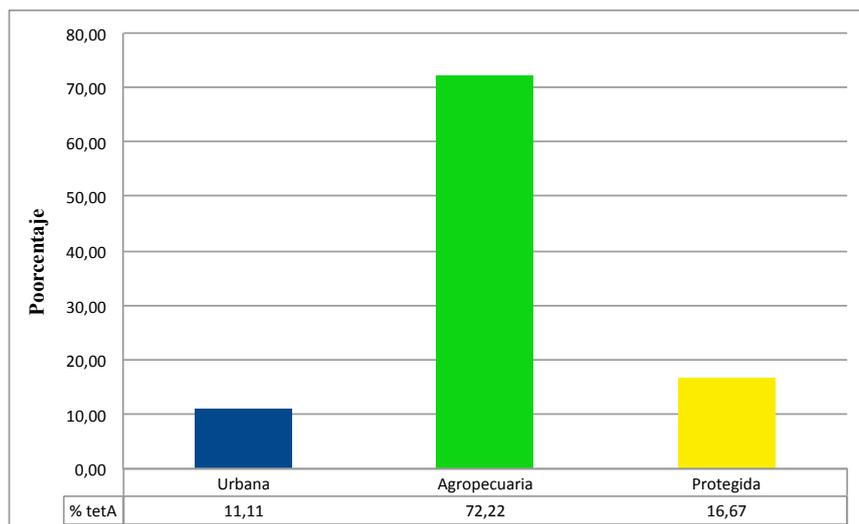
#### 4.2.2.2. Identificación de gen de resistencia a la tetraciclina (*tetA*)

Se identificó el gen *tetA* en el 83,7% (n= 36/43) de las cepas fenotípicamente resistentes a la tetraciclina (ver Figura 11).



**Figura 11.** Producto de amplificación del gen *tetA* en cepas de *Escherichia coli* correspondiente a las zonas urbana (B), agropecuaria (Be) y protegida (K) de la Isla Santa Cruz; control positivo (C+), control negativo (C-), marcador de peso molecular (L).

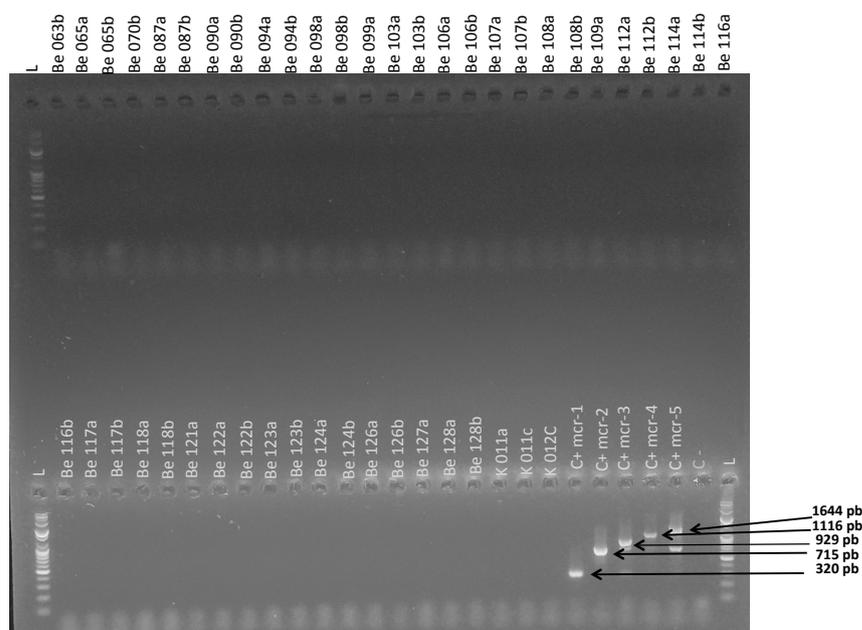
De acuerdo con la zona muestreada, el porcentaje en las diferentes zonas de la Isla se muestra en la figura 12. El mayor número de cepas positivas al gen *tetA* ( $n=26/36$ ) se observaron en la zona agropecuaria; la zona urbana ( $n=4/36$ ) y protegida ( $n=6/36$ ) amplificaron en bajo número el gen sin embargo no existió diferencia significativa entre estas dos zonas.



**Figura 12.** Proporción de cepas de *Escherichia coli* fenotípicamente resistentes a la tetraciclina en las que se identificó el gen *tetA* en las zonas urbana, agropecuaria y protegida de la Isla Santa Cruz.

#### 4.2.2.3. Identificación de genes de resistencia a la colistina (*mcr-1* a *5*)

Los genes de resistencia a la colistina *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* y *mcr-5* no fueron identificados en los aislados de *E. coli* de la Isla Santa Cruz (n= 0/136). Los controles positivos amplificaron los fragmentos esperados (ver Figura 13).



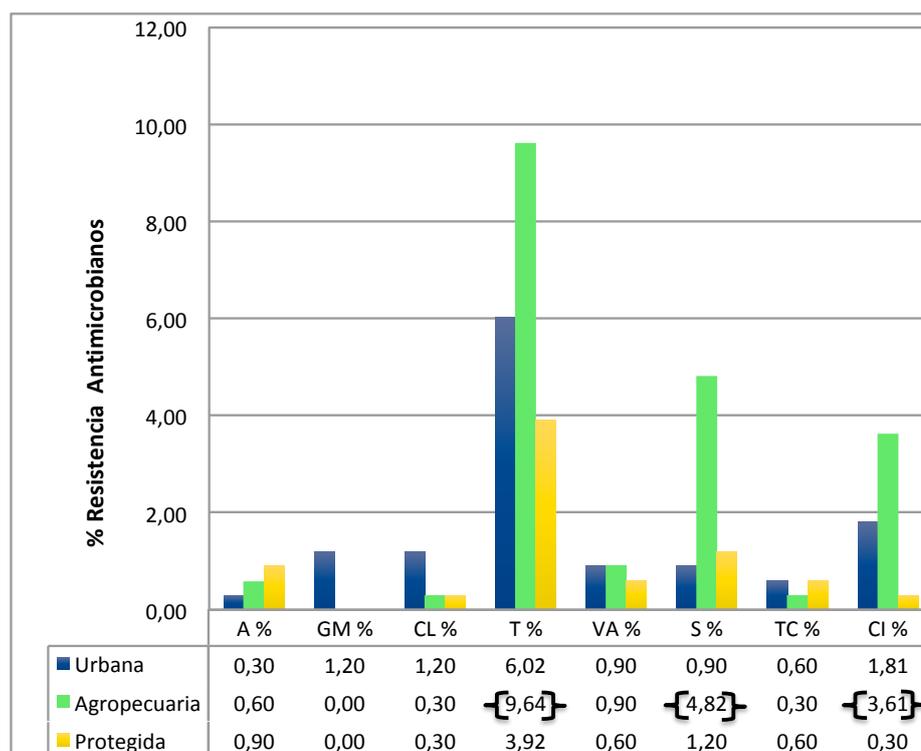
**Figura 13.** Muestras negativas en reacción Multiplex PCR para la identificación de los genes *mcr-1* a *mcr-5* en cepas de *Escherichia coli* de la zona agropecuaria (Be) y protegida (K) de la Isla Santa Cruz; control positivo (C+), control negativo (C-), marcador de peso molecular (L).

#### 4.2.3. Determinación fenotípica de perfiles de resistencia a los antimicrobianos en *Enterococcus* spp.

Se determinó fenotípicamente la resistencia a los antimicrobianos (WHO / AGISAR, 2017) de 332 cepas aisladas de *Enterococcus* spp. Se registró una resistencia del

19,58% (n= 65/332) a la tetraciclina, 6,93% (n= 23/332) a la estreptomicina, 5,72% (4/332) a la ciprofloxacina, 2,41% (n= 8/332) a la vancomicina, 1,81% (n= 6/332) a la ampicilina, 1,81% (n= 6/332) al cloranfenicol, 1,20% (n= 4/332) a la gentamicina y 1,20% (n= 4/332) a la teicoplanina.

El porcentaje de resistencia por zonas muestreadas de la Isla varió dependiendo del antibiótico y de la zona muestreada (ver Figura 14). Se determinó la asociación entre la RAM y la zona muestreada ( $p \leq 0,05$ ). Estas fueron estadísticamente significativas para tetraciclina ( $p < 0,0105$ ), estreptomicina ( $p < 0,0009$ ) y ciprofloxacina ( $p < 0,0076$ ). En la zona agropecuaria se observó una mayor proporción de RAM para los 3 antimicrobianos ( $p < 0,0001$ ).



A: Ampicilina, GM: Gentamicina CI: Ciprofloxacina, CL: Cloranfenicol, S: Estreptomicina, T: Tetraciclina, TC: Teicoplanina, VA: Vancomicina

**Figura 14.** Proporción de RAM en cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de las zonas urbana, agropecuaria y protegida de la Isla Santa Cruz.

Se identificaron 7 cepas de *Enterococcus* spp. MDR. El 57,1% ( $n = 4/7$ ) de las cepas presentó un perfil de resistencia para 4 antimicrobianos, el 42,9% ( $n = 3/7$ )

para 3 antimicrobianos diferentes.

Los perfiles de resistencia a los antimicrobianos en las cepas aisladas de *Enterococcus* spp., se presentan en la tabla 6.

**Tabla 6.** Perfil Fenotípico de Resistencia Antimicrobiana en Cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de Pinzones (*Geospiza* spp.).

Perfil	Número Antibióticos	Número de Cepas con el Perfil	Multirresistencia (MDR)
A+T+VA+TC	4	3	3
T+S+CI	3	2	2
CL+T+CI	3	1	1
CL+T+S	3	1	1
CL + T	2	4	0
S+CI	2	1	0
T+CI	2	3	0
T+S	2	10	0
VA+TC	2	1	0
A	1	3	0
GM	1	4	0
T	1	41	0
S	1	9	0
CI	1	12	0
No Sensibles	NA	77	NA
Sensible	NA	160	NA

A:

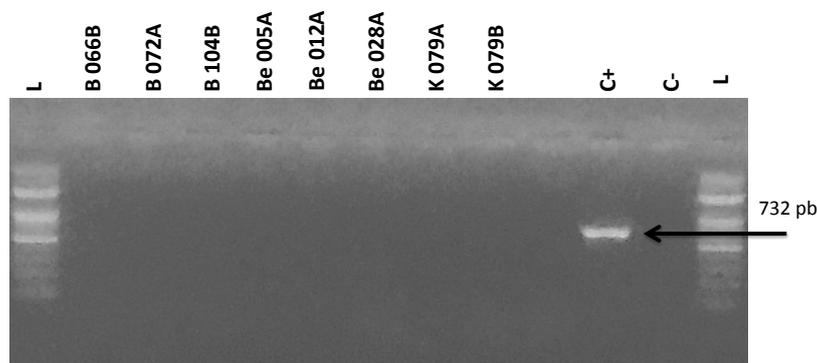
Ampicilina, GM: Gentamicina CI: Ciprofloxacina, CL: Cloranfenicol, S: Estreptomicina,

T: Tetraciclina, TC: Teicoplanina, VA: Vancomicina

#### 4.2.4. Determinación de genes de resistencia a los antimicrobianos de importancia crítica en *Enterococcus* spp.

##### 4.2.4.1. Identificación de gen resistencia a la vancomicina (*vanA*)

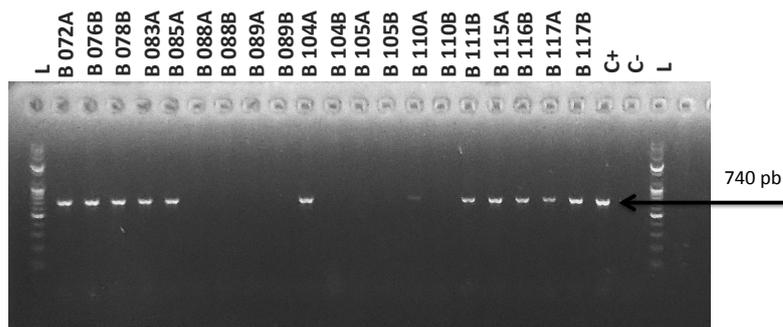
El gen de resistencia *vanA* no fue identificado en los aislados de *Enterococcus* spp. con perfil fenotípico de resistencia a la vancomicina (n= 8/332). El control positivo amplificó el fragmento esperado (ver Figura 15).



**Figura 15.** Muestras negativas para identificación por PCR del gen *vanA* en cepas de *Enterococcus* spp. de la zona urbana (B), agropecuaria (Be) y protegida (K) de la Isla Santa Cruz; control positivo (C+), control negativo (C-), marcador de peso molecular (L).

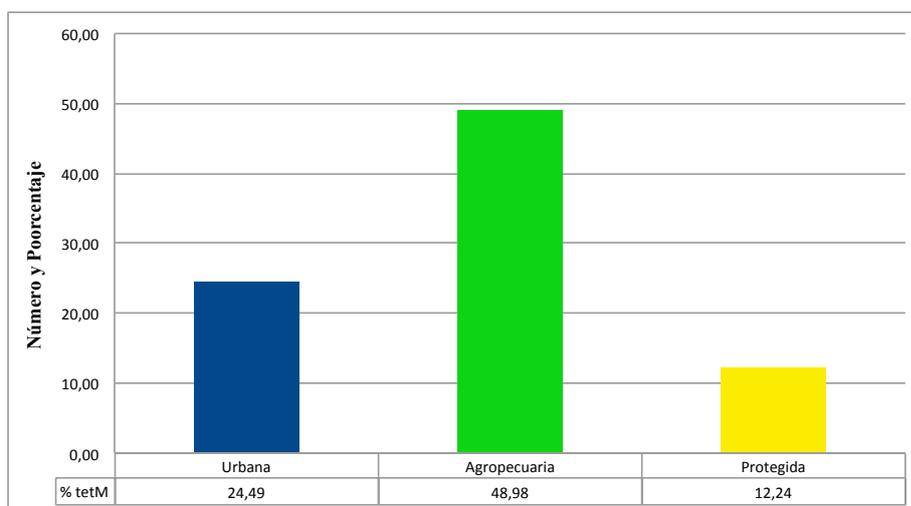
##### 4.2.5. Identificación del gen de resistencia a la tetraciclina (*tetM*)

Se identificó el gen *tetM* en el 75,4% (n= 49/65) de las cepas fenotípicamente resistentes a la tetraciclina (ver Figura 16).



**Figura 16.** Ejemplo de productos de amplificación del gen *tetM* en cepas de *Enterococcus* spp. correspondientes a la zona urbana (B) de la Isla Santa Cruz; control positivo (C+), control negativo (C-), marcador de peso molecular (L).

En la Figura 17 se muestran los porcentajes de resistencia según la zona muestreada de la Isla. El gen se identificó en mayor número en la zona agropecuaria (n= 24/49); se observaron 12/49 cepas positivas al gen *tetM* en la zona urbana y 6/49 en la zona protegida, sin embargo no existió diferencia significativa entre estas.



**Figura 17.** Proporción de cepas de *Enterococcus* spp. fenotípicamente resistentes a la tetraciclina en las que se identificó el gen *tetM* en las zonas urbana,

agropecuaria y protegida de la Isla Santa Cruz.

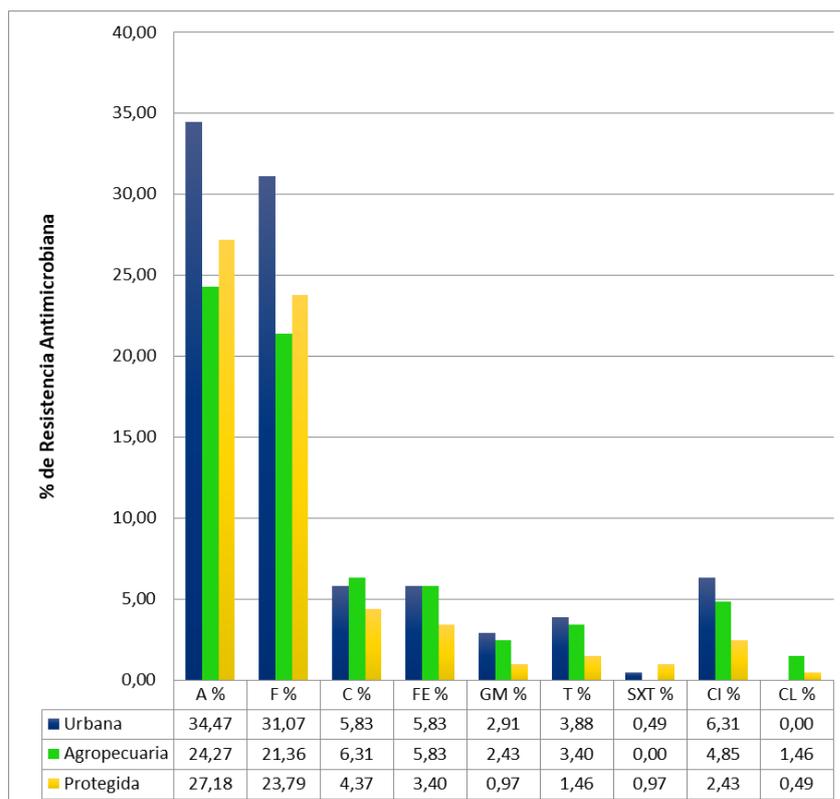
#### **4.3. Determinación fenotípica y perfiles de resistencia a los antimicrobianos en *Enterobacter* spp.**

Se determinó fenotípicamente la resistencia a los antimicrobianos (WHO / AGISAR, 2017) en 206 cepas aisladas de *Enterobacter* spp. Se identificó una resistencia del

85,9% (n= 177/206) a la ampicilina, 76,2% (157/206) a la cefoxitina, 16,5% (n= 34/206) a la cefotaxima, 15,1% (n= 31/206) a cefepima, 13,6% (n= 28/206) a la ciprofloxacina, 8,7% (n= 18/206) a la tetraciclina, 6,3% (n= 13/206) a la gentamicina, 1,9% (n= 4/206) al cloranfenicol y 1,4% (n= 3/206) a la trimetoprima sulfametoxazol.

El porcentaje de resistencia por zonas muestreadas de la Isla, varió dependiendo del antibiótico y de la zona muestreada (ver Figura 18).

Se determinó la asociación entre la RAM y la zona muestreada ( $p \leq 0,05$ ), sin embargo, no se identificó diferencia estadísticamente significativa para ninguno de los antimicrobianos ( $p < 0,0619$ ).



A: Ampicilina, F: Cefoxitina, C: Cefotaxima, FE: Cefepime, T: Tetraciclina, SXT: Trimetoprima Sulfametoxazol, CI: Ciprofloxacina, CL: Cloranfenicol.

**Figura 18.** Proporción de RAM en cepas de *Enterobacter* spp. aisladas de las zonas urbana, agropecuaria y protegida de la Isla Santa Cruz.

Se observaron 49 cepas de *Enterobacter* spp. MDR. El 2% (n= 1/49) de las cepas presentó un perfil de resistencia para 8 antimicrobianos, el 18,4% (n= 9/49) para 6 antimicrobianos, el 22,4% (n= 11/49) para 5 antimicrobianos, el 26,5% (n= 13/49) para 4 antimicrobianos y el 34,7% (n= 17/49) presentó resistencia para 3 antimicrobianos diferentes.

Los perfiles de resistencia a los antimicrobianos en las cepas aisladas de

*Enterobacter* spp., se presentan en la tabla 7.

**Tabla 7.** Perfil Fenotípico de Resistencia Antimicrobiana en cepas de *Enterobacter* spp. aisladas de Pinzones (*Geospiza* spp.)

Perfil	Número Antibióticos	Número de Cepas con el Perfil	Multirresistencia (MDR)
A+F+C+FE+GM+CI+CL	8	1	1
A+F+C+FE+GM+T	6	1	1
A+F+C+FE+GM+CI	6	6	6
A+F+C+FE+T+CI	6	1	1
A+F+C+FE+SXT+CI	6	1	1
A+C+FE+GM+CIP	5	1	1
A+F+C+FE+SXT	5	1	1
A+F+C+T+CI	5	1	1
A+F+C+FE+CI	5	4	5
A+F+C+FE+GM	5	1	1
A+F+FE+GM+CI	5	1	1
A+F+T+CI+CL	5	1	1
F+FE+GM+T+CI	5	1	1
A+F+C+FE	4	5	5
A+F+C+T	4	1	1
A+F+FE+T	4	2	2
A+F+FE+CI	4	3	3
A+F+T+CL	4	1	1
A+T+SXT+CL	4	1	1
A+F+C	3	9	9
A+F+GM	3	4	1
A+F+T	3	1	1
A+F+CI	3	3	3
A+F	2	94	0
A+T	2	2	0
FE+CI	2	1	0
A	1	14	0
F	1	13	0
T	1	1	0
CI	1	2	0
SENSIBLE		0	28
			NA

A: Ampicilina, F: Cefoxitina, C: Cefotaxima, FE: Cefepime, T: Tetraciclina, SXT: Trimetoprima Sulfametoxazol, CI: Ciprofloxacina, CL: Cloranfenicol.

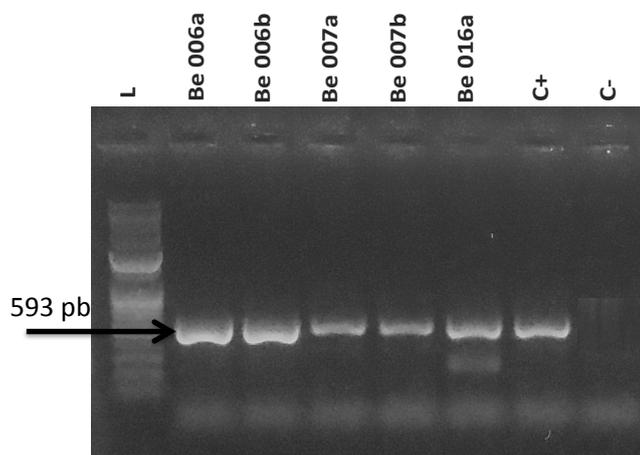
#### 4.3.1. Determinación de genes de resistencia a los antimicrobianos de importancia crítica en *Enterobacter* spp.

##### 4.3.1.1. Identificación de genes de betalactamas (*bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CMY</sub>)

Al igual que para *E. coli*, se identificaron los genes que codifican para

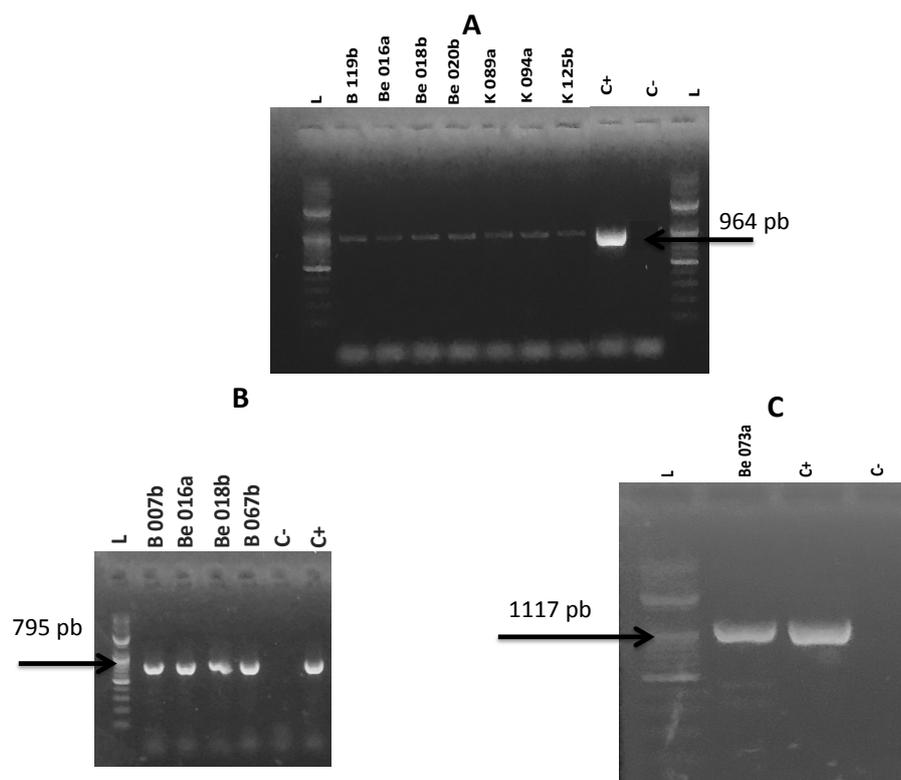
betalactamasas, de acuerdo con los parámetros de inclusión fenotípicos de resistencia.

Se identificó el gen *bla*<sub>CTX-M</sub> en el 11,8% (n= 4/34) de las cepas de *Enterobacter* spp. con resistencia fenotípica a la cefotaxima (ver Figura 19).



**Figura 19.** Producto de amplificación del gen *bla*<sub>CTX-M</sub> en la zona agropecuaria (Be) de la Isla Santa Cruz; control positivo (C+), control negativo (C-), marcador de peso molecular (L).

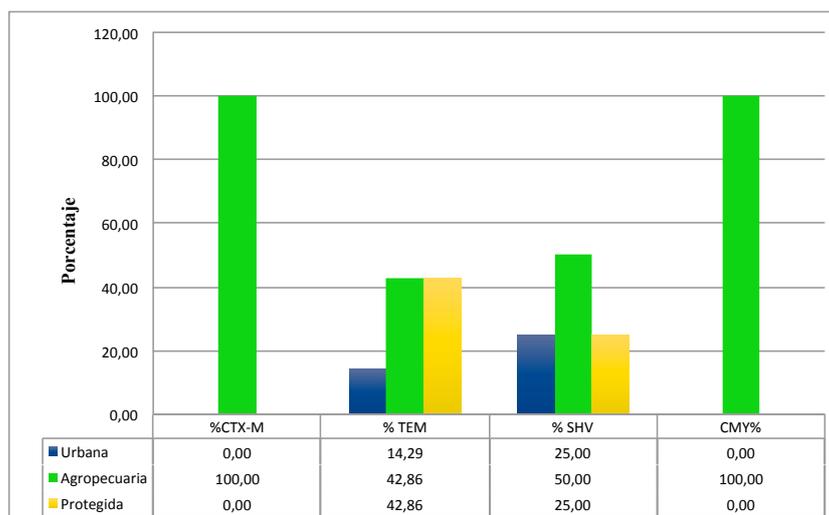
Los genes que codifican para las betalactamasas *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CMY</sub>, fueron rastreados en aquellas cepas fenotípicamente resistentes a la ampicilina (n= 177/206). Así, *bla*<sub>TEM</sub> se determinó en el 3,95% (n= 7/177) de las cepas, *bla*<sub>SHV</sub> en el 2,26% (n= 4/177) y *bla*<sub>CMY</sub> en el 0,6% (n= 1/177) de las cepas (ver Figura 20).



**Figura 20.** Producto de amplificación del gen *bla*<sub>TEM</sub> (A), gen *bla*<sub>SHV</sub> (B) y *bla*<sub>CMY</sub> (C) en las zonas urbana (B), zona agropecuaria (Be) y protegida (K) de la Isla Santa Cruz; control positivo (C+), control negativo (C-), marcador de peso molecular (L).

También, se determinó el porcentaje para los genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CMY</sub>, en las tres zonas muestreadas (ver figura 21). El gen que codifica para la betalactamasa *bla*<sub>CTX-M</sub> se observó en cepas de *Enterobacter* spp. (n=4/4) correspondientes a la zona agropecuaria; los genes para *bla*<sub>TEM</sub>, se determinó en la zona urbana (n= 1/7), en la zona agropecuaria (n= 3/7) y en la zona protegida (n= 3/7). Los genes para la enzima *bla*<sub>SHV</sub> se identificaron en la zona urbana (n= 1/4), en la zona agropecuaria (n= 2/4) y en la zona protegida (n= 1/4). Solo una cepa amplificó para el gen *bla*<sub>CMY</sub> (n= 1/1) y esta correspondió a la zona agropecuaria

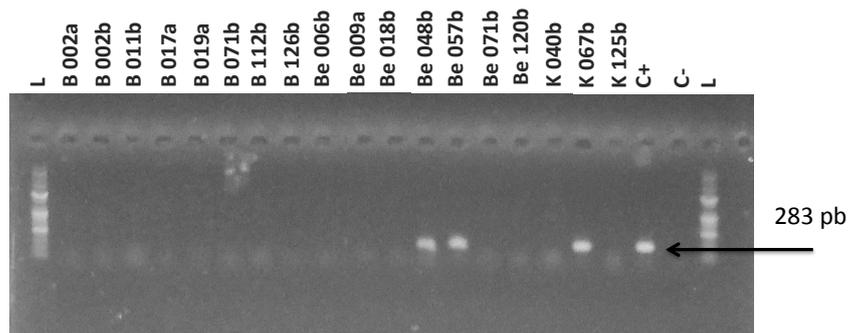
de la Isla.



**Figura 21.** Proporción de cepas de *Enterobacter* spp. fenotípicamente resistentes a la ampicilina en las que se identificaron los genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CMY</sub> en las zonas agropecuaria y protegida de la Isla Santa Cruz.

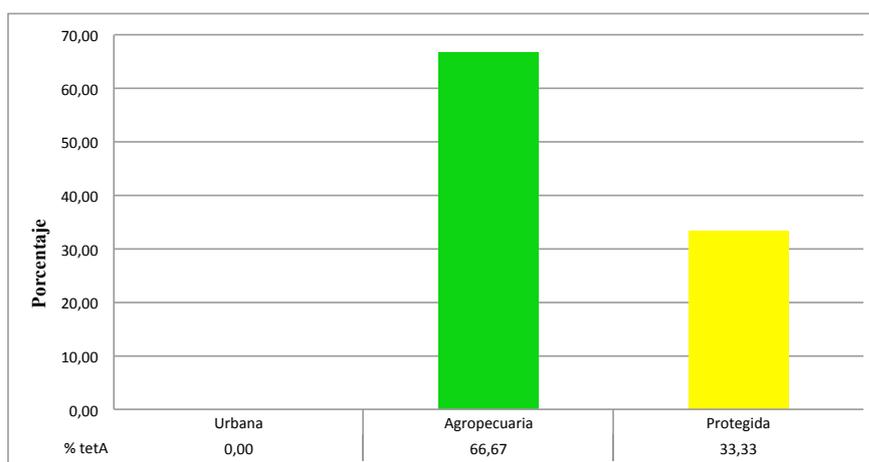
#### 4.3.1.2. Identificación de gen de resistencia a la tetraciclina (*tetA*)

EL gen *tetA* que codifica para la resistencia a la tetraciclina, se observó en el 16,7% (n= 3/18) de las cepas fenotípicamente resistentes a la tetraciclina (ver Figura 22).



**Figura 22.** Producto de amplificación del gen *tetA* en cepas de *Enterobacter* spp. correspondientes a las zonas urbana (B), agropecuaria (Be) y protegida (K) de la Isla Santa Cruz; control positivo (C+), control negativo (C-), marcador de peso molecular (L).

A su vez, se determinó el porcentaje de resistencia de acuerdo con las zonas muestreadas en la Isla (ver Figura 23). El mayor número de cepas positivas al gen *tetA* ( $n= 2/3$ ) se observó en la zona agropecuaria; se identificó una cepa en la zona protegida ( $n= 1/3$ ), y no hubo amplificación del gen en la zona urbana ( $0/3$ ).



**Figura 23.** Proporción de cepas de *Enterobacter* spp. fenotípicamente resistentes a la tetraciclina en las que se identificó el gen *tetA* en las zonas agropecuaria y protegida de la Isla Santa Cruz.

El gen *tetA* no se identificó en el 83,3% (n= 15/18) de las cepas de *Enterobacter* spp. fenotípicamente resistentes a la tetraciclina.

#### **4.3.1.3. Identificación de genes de resistencia a la colistina (*mcr-1* a *5*)**

Genes de resistencia a la colistina *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* y *mcr-5*, no fueron identificados en los aislados de *Enterobacter* spp. en ningún aislado de las tres zonas de la Isla Santa Cruz (n= 0/206).

#### **4.4. Resistencia antimicrobiana integral en pinzones de Darwin**

Los resultados fenotípicos y genotípicos de la resistencia a los antimicrobianos en cepas bacterianas centinela de pinzones se pueden observar en la tabla 8.

**Tabla 8.** Perfil Fenotípico y Genotípico de Resistencia Antimicrobiana en Cepas de Centinela aisladas de Pinzones (*Geospiza* spp.)

Cepa	Perfil de Resistencia	Genes de Resistencia	Número de Cepas
<i>Escherichia coli</i>	A+F+C+FE+T+SXT+CI+CL	blaTEM; tetA	1
<i>Escherichia coli</i>	A+F+T+SXT+CI	tetA	1
<i>Escherichia coli</i>	A+F+T+SXT+CL	tetA	1
<i>Escherichia coli</i>	A+T+SXT+CI+CL	blaTEM; tetA	1
<i>Escherichia coli</i>	A+F+T+CL	tetA	2
<i>Escherichia coli</i>	A+T+SXT+CI	blaTEM; tetA	3
<i>Escherichia coli</i>	A+T+SXT+CL	blaTEM; tetA	5
<i>Escherichia coli</i>	A+T+SXT+CL	tetA	1
<i>Escherichia coli</i>	A+T+CI+CL	tetA	1
<i>Escherichia coli</i>	A+F+T	tetA	1
<i>Escherichia coli</i>	A+T+SXT	blaTEM; tetA	2
<i>Escherichia coli</i>	A+T+CL	tetA	1
<i>Escherichia coli</i>	A+SXT+CI	blaTEM	1
<i>Escherichia coli</i>	A+T	tetA	4
<i>Escherichia coli</i>	A+SXT	blaTEM	3
<i>Escherichia coli</i>	T+SXT+CI+CL	tetA	1
<i>Escherichia coli</i>	T+SXT+CL	tetA	3
<i>Escherichia coli</i>	T+SXT	tetA	2
<i>Escherichia coli</i>	A	blaSHV	1
<i>Escherichia coli</i>	T	tetA	6
<i>Enterococcus</i>	A+T+VA+TC	tetM	2
<i>Enterococcus</i>	T+S+CI	tetM	2
<i>Enterococcus</i>	CL+T	tetM	4
<i>Enterococcus</i>	T+CI	tetM	2
<i>Enterococcus</i>	T+S	tetM	7
<i>Enterococcus</i>	CL+T+S	tetM	1
<i>Enterococcus</i>	T	tetM	31
<i>Enterobacter</i> spp.	A+F+C+FE+GM+T+CI+CL	blaTEM; blaSHV	1
<i>Enterobacter</i> spp.	A+F+C+FE+GM+T	blaCTXM	1
<i>Enterobacter</i> spp.	A+F+C+FE+GM+CI	blaCTXM	1
<i>Enterobacter</i> spp.	A+F+T+CIP+CL	tetA	1
<i>Enterobacter</i> spp.	A+F+C+FE	blaTEM	1
<i>Enterobacter</i> spp.	A+F+FE+CI	blaCTXM; blaTEM; blaSHV	1
<i>Enterobacter</i> spp.	A+F+C+T	blaTEM	1
<i>Enterobacter</i> spp.	A+F+T+CL	tetA	1
<i>Enterobacter</i> spp.	A+T+SXT+CL	tetA	1
<i>Enterobacter</i> spp.	A+F+C	blaCTXM	1
<i>Enterobacter</i> spp.	A+F+GM	blaSHV	1
<i>Enterobacter</i> spp.	A+F	blaTEM	1
<i>Enterobacter</i> spp.	A+F	blaTEM	1
<i>Enterobacter</i> spp.	A+F	tetA	1
<i>Enterobacter</i> spp.	A	blaTEM	1
<i>Enterobacter</i> spp.	A	blaCMY	1

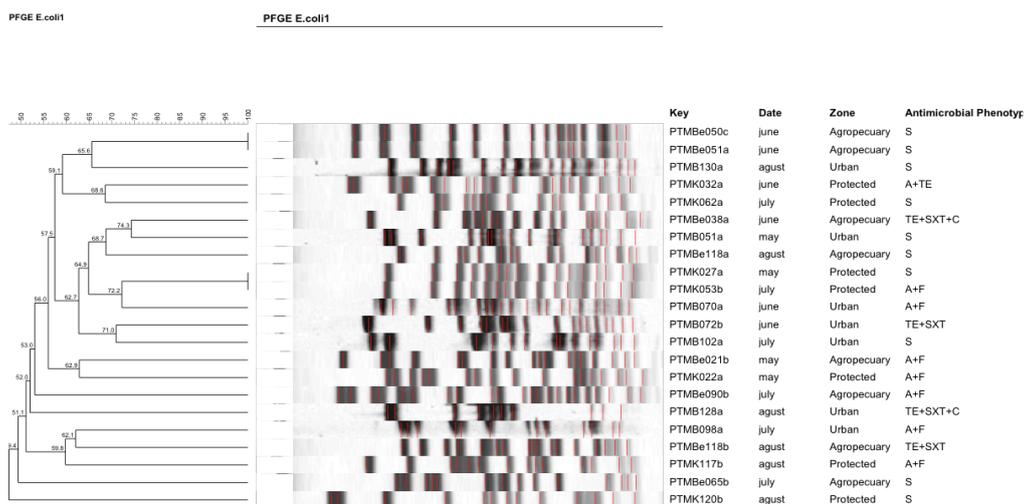
A: Ampicilina, F: Cefoxitina, C: Cefotaxima, FE: Cefepime, T: Tetraciclina, SXT: Trimetoprima Sulfametoxazol, GM: Gentamicina, CI: Ciprofloxacina, CL: Cloranfenicol, S: Estreptomycin, VA: Vancomicina, TC: Teicoplanina.

#### 4.5. Genotipificación de aislados de *Escherichia coli* mediante Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)

Se realizó el análisis por PFGE a 22 cepas de *Escherichia coli* aisladas de las tres

zonas muestreadas de la Isla Santa Cruz.

Se obtuvieron 20 perfiles genéticos diferentes. Los pulso tipos presentaron de 13 a 21 bandas, con fragmentos de ADN de entre 28,5 y 1135 Kb. Los resultados del dendograma, indicaron que no existió clonalidad de las cepas de *E. coli* aisladas en el estudio, entre las zonas urbana, agropecuaria y protegida de la Isla (Figura 24).

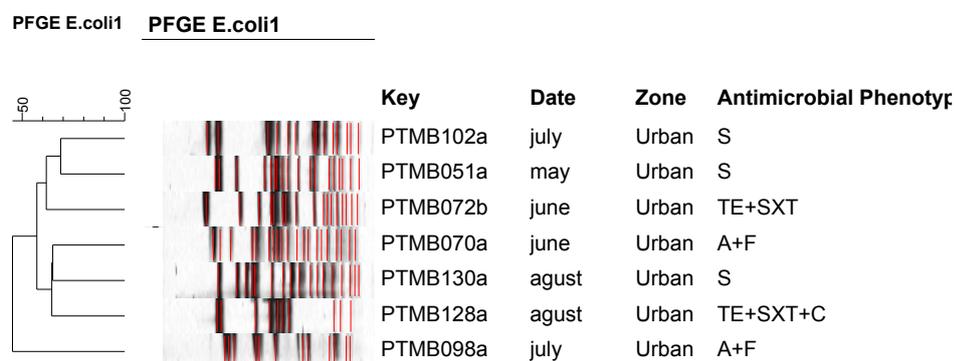


A: Ampicilina, F: Cefoxitina, T: Tetraciclina, SXT: Trimetoprima Sulfametoxazol, CL: Cloranfenicol. PTMB (Pinzón Terrestre Muestra Urbana), PTMBe (Pinzón Terrestre Muestra Agropecuaria), PTMK (Pinzón Terrestre Muestra Protegida).

**Figura 24.** Dendograma de cepas de *Escherchia coli* aisladas de las zonas urbana, agropecuaria y protegida de la Isla Santa Cruz. UPGMA-Bionumerics 8.0.

Se realizó la comparación del pulso tipo de las cepas de cada una de las zonas, a fin de determinar clonalidad entre las mismas. En la zona urbana de la Isla, se identificaron 7 genotipos diferentes entre las cepas analizadas (n= 7/22), es decir

no se observó clonalidad entre cepas de *Escherchia coli* en esta zona (ver figura 25).

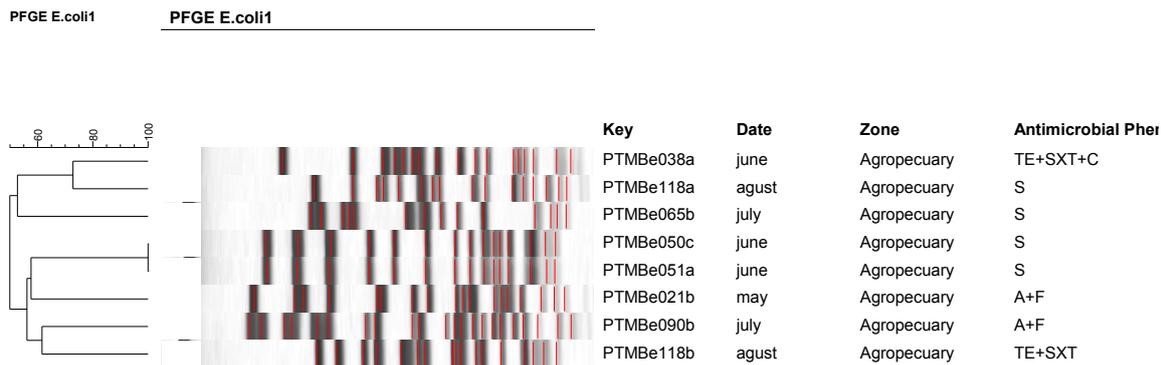


A: Ampicilina, F: Cefoxitina, T: Tetraciclina, SXT: Trimetoprima Sulfametoxazol, CL: Cloranfenicol.

PTMB (Pinzón Terrestre Muestra Urbana).

**Figura 25.** Dendrograma de cepas de *Escherchia coli* aisladas de la zona urbana de la Isla Santa Cruz. UPGMA-Bionumerics 8.0.

En la zona agropecuaria se identificaron 7 genotipos diferentes entre las cepas analizadas (n= 8/22). Se identificó un patrón de bandas similar entre las cepas PTMBe 050c y PTMBe 051c. Los dos clones fueron colectados en la misma fecha (17/06/2019) y presenta el mismo perfil de sensibilidad antimicrobiana (ver Figura 26).

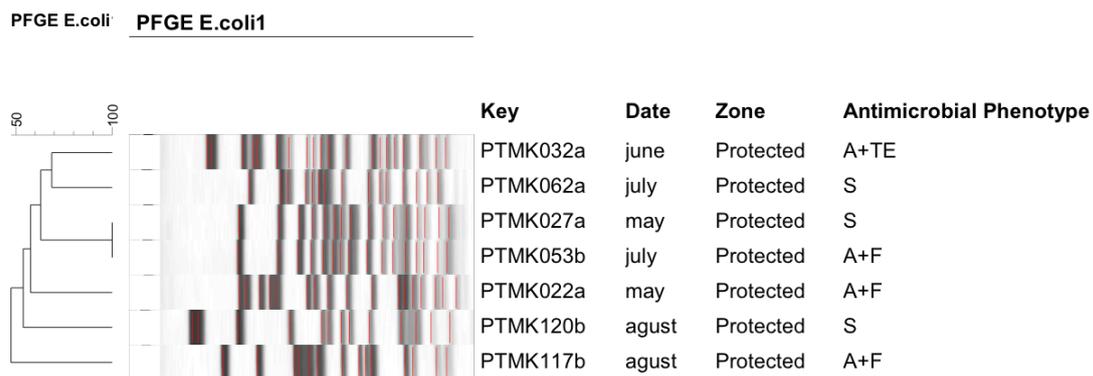


A: Ampicilina, F: Cefoxitina, T: Tetraciclina, SXT: Trimetoprima Sulfametoxazol, CL: Cloranfenicol.

PTMBe (Pinzón Terrestre Muestra Agropecuaria).

**Figura 26.** Dendrograma de cepas de *Escherchia coli* aisladas de la zona agropecuaria de la Isla Santa Cruz.

Finalmente, se realizó el análisis del pulso tipo de las cepas de *E. coli* aisladas de la zona protegida de la Isla ( $n= 7/22$ ). Se identificaron 6 genotipos diferentes, existiendo clonalidad entre las cepas PTMK 027a y PTMK 053b, colectadas en fechas diferentes, la primera el 28 de mayo de 2019 y la segunda el 26 de julio de 2019. Además, las cepas tenían diferente perfil de RAM, PTMK027a correspondió a una cepa sensible, y PTMK 053b a una cepa con perfil de resistencia a la ampicilina y cefoxitina (ver Figura 27).



A: Ampicilina, F: Cefoxitina, T: Tetraciclina, SXT: Trimetoprima Sulfametoxazol, CL: Cloranfenicol. PTMK (Pinzón Terrestre Muestra Protegida).

**Figura 27.** Dendrograma de cepas de *Escherchia coli* aisladas de la zona protegida de la Isla Santa Cruz.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Cepas centinela en pinzones de Darwin (*Geospiza* spp.)

En este estudio se pudieron aislar e identificar bacterias centinela de RAM a partir de hisopados cloacales de pinzones de Darwin en la Isla Santa Cruz. Se aisló un menor porcentaje de *E. coli* (n= 136) en relación con *Enterococcus* (n= 332) y a *Enterobacter* spp. (n= 206), esta última a pesar de no haber sido propuesta como bacteria indicadora.

Las aves poseen una microbiota intestinal diversa (Waite y Taylor, 2015), y la de los passeriformes está conformada principalmente por los filos Proteobacterias, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria y Tenericute (Cho y Lee, 2020). Este es el caso también de los pinzones de Darwin, en los que un estudio realizado sobre el microbioma de 12 de las 19 especies descritas (n= 114) a lo largo de las Islas Galápagos, observó una dominancia del filo Firmicutes con un 50%, Proteobacterias en un 40% y Actinobacteria en un 8% (Michel y col., 2018). Esto explicaría de alguna manera, porqué *Enterococcus* spp. fue aislado en mayor proporción ( $p < 0,0001$ ) en relación con las Proteobacterias *E. coli* y *Enterobacter* spp.

Si se analizan los porcentajes de aislados según el área estudiada, *E. coli*, se encontró en mayor proporción en la zona agropecuaria ( $p < 0,0001$ ) de la Isla., mientras que, en la zona urbana, la de mayor proporción fue para *Enterococcus* spp. ( $p < 0,0028$ ) y *Enterobacter* spp. ( $p < 0,0086$ ). Algunos factores, como la dieta y el ambiente (Knutie y col., 2019; Michel y col., 2018; Waite y Taylor, 2015), podrían afectar el microbioma intestinal de las aves. Durante el proceso de

radiación adaptativa en los pinzones, la composición de esta microbiota se ha mantenido conservada en la mayoría de las especies (Michel y col., 2018). Sin embargo, se sabe que la influencia del hombre en la alimentación de estas aves con la introducción de alimentos artificiales, estarían modificando la composición microbiana intestinal (Knutie y col., 2019), (Cho y Lee, 2020). Estos cambios en la microbiota, también se han observado por la existencia de diferencias en la estación climática del año (húmeda o seca) debido a cambios en las fuentes de alimentos o al apareamiento o anidación de las aves (Michel y col., 2018)

## **5.2. Resistencia fenotípica a los antimicrobianos en *Escherichia coli***

Los animales silvestres son indicadores de la RAM en el ambiente, permitiendo identificar mecanismos de resistencia circulantes dentro de un ecosistema. A través de la fauna silvestre, es posible determinar reservorios, vectores o fuentes de bacterias MDR en humanos y animales (Dolejska y Literak, 2019). Las especies silvestres son buenos indicadores de resistencia antimicrobiana dentro de ambientes locales, permitiendo visualizar fuentes potenciales de contaminación de tipo antropogénico (Ramey y Ahlstrom, 2020).

A su vez, las aves silvestres al ser consideradas centinelas de RAM han permitido realizar estudios en tiempo y espacio a fin de identificar el papel de estas en la epidemiología de la resistencia a los antimicrobianos. (Bonnedahl y Järhult, 2014)

Existen algunos ejemplos de investigaciones relacionadas a la determinación de la RAM en aves silvestres paseriformes, rapaces, acuáticas, entre otras, en diversos ambientes, (Silva y col., 2009; Santos y col., 2013; Giacobello y col., 2016; Foti y col., 2017; ). En las Islas Galápagos, se ha analizado la RAM en diferentes

especies de animales endémicos (Franco y col., 2011; Thaller y col., 2010; Wheeler y col., 2012), sin embargo, no se han realizado investigaciones de la RAM en aves silvestres de las Islas.

Al determinar la proporción entre la RAM y la zona muestreada en nuestro estudio, esta fue estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) para ampicilina, tetraciclina, trimetoprima sulfametoxazol y cloranfenicol en la zona agropecuaria.

Es así, que el porcentaje de resistencia a la ampicilina en las cepas de *E. coli* aisladas, concuerda con los resultados descritos por Giacobello y col., (2016) en Italia, en el cual se analizaron enterobacterias en aves silvestres rapaces, acuáticas y paserinos, y se identificó el 51,8% ( $n = 43/83$ ) de resistencia a la ampicilina. También en aves silvestres carroñeras (*Neophron percnopterus*) de la Península Ibérica, donde las cepas de *E. coli*, fueron resistentes a betalactámicos, entre ellos la ampicilina y amoxicilina (Blanco y col., 2007). De igual manera en el estudio de Skarżyńska y col., (2021), la ampicilina tuvo una resistencia del 41,4% ( $n = 29/70$ ), siendo uno de los valores de RAM más altos dentro del estudio.

El alto porcentaje de resistencia a la ampicilina en la zona agropecuaria de la Isla, podría estar relacionada con el amplio uso de diversos agentes antimicrobianos en prácticas pecuarias (Blanco y col., 2007). Se sabe que el uso de antibióticos, ejerce una presión de selección, favoreciendo la RAM en estas comunidades microbianas (Wall y col., 2016). En este contexto, las penicilinas semi sintéticas, como la ampicilina, son antimicrobianos de uso común en cerdos y aves (EMA, 2014), lo que explicaría el alto porcentaje de resistencia a estos antibióticos.

Por otro lado, el porcentaje de resistencia a la ampicilina en la zona protegida no difirió de la agropecuaria. Estos resultados podrían estar relacionados con su cercanía, y la posible migración de aves, desde la zona agropecuaria a la zona protegida. Las aves silvestres migratorias pueden portar y diseminar determinantes genéticos de resistencia a los antimicrobianos en el ambiente (Wang y col., 2017). También, podría ser el agua que es llevada en camiones para asentar el polvo del camino hacia las minas de granillo rojo, cercanas al área de muestreo. Sin embargo, futuras investigaciones determinarán la relación de la RAM entre estas dos zonas de la Isla.

La resistencia a la tetraciclina fue la segunda RAM más alta en esta investigación. Estos datos son comparables con lo descrito por Giacobello y col., (2016), quienes reportaron una resistencia a la tetraciclina, del 48,2% (n= 40/83) en diversas aves silvestres de Europa. Sin embargo difieren del estudio realizado en el archipiélago de Azores, Portugal, en aves silvestres (n=208) entre las que se incluyeron 9 especies de paseriformes (Santos y col., 2013). En este estudio, del 24,3% (n= 28/115) de aislados de *Esherichia coli* que presentaron resistencia, el 17,9% (n= 5/28) correspondió a la tetraciclina.

El mayor porcentaje de resistencia a la tetraciclina, de igual manera se observó en la zona agropecuaria. La resistencia a este antibiótico, estaría relacionada a su uso extensivo como terapéutico, profiláctico y como promotor de crecimiento en ganado (Michalova y col., 2004). Además, el alto porcentaje de resistencia a este antimicrobiano, está asociado con la rápida diseminación de la resistencia debido a la adquisición de determinantes genéticos a través de plásmidos, transposones e

integrones (Chopra y Roberts, 2001).

En lo que respecta a la resistencia reportada en nuestro estudio a la trimetoprima sulfametoxazol, los datos son similares a los observados por Foti y col., (2017), quienes observaron un 12,3% (n= 15/122) de resistencia a SXT en cepas aisladas de enterobacterias a partir de hisopados cloacales de aves paseriformes en un bosque protector (Metaponto) en Italia. A diferencia de nuestra investigación, Guenther y col., (2010), identificaron un 80% (n=12/15) de resistencia a las sulfonamidas en cepas de *E. coli* procedentes de aves silvestres en Alemania; este porcentaje sería mayor, debido a el que análisis se lo realizó solamente en cepas con perfil MDR.

El valor de RAM observado en sulfonamidas fue, el tercero mayor entre los antimicrobianos analizados en este estudio. Estos resultados, se relacionan con el estudio de Pinto y col., (2010), quienes identificaron un 18,8% (n= 6/32) de resistencia a este antibiótico en cepas de *E. coli* BLEE aisladas de aves silvestres de presa en Portugal. La zona de la Isla Santa Cruz analizada en este estudio se dedica en su mayoría a la producción avícola. Al ser las sulfonamidas, un antibiótico utilizado ampliamente como tratamiento y profiláctico en aves (Cheong y col., 2010), se podría explicar la RAM, aunque limitada, en esta zona.

Se observó resistencia al cloranfenicol, la cual se presentó con mayor proporción en la zona agropecuaria. Sin embargo, difiere del reporte de Atterby y col., (2016), quienes determinaron un 7% (n= 4/55) de resistencia al cloranfenicol en aislados de *E. coli* en gaviotas en una zona urbana de Alaska. El uso de florfenicol en medicina veterinaria, podría también estar mediando la resistencia al

cloranfenicol o podría haber dado origen a otros mecanismos de resistencia (Schwarz y col., 2004). También se ha descrito una asociación entre genes de virulencia bacterianos y la resistencia al cloranfenicol, lo que explicaría su presencia pese a no existir una presión de selección (Schwarz y col., 2004). Por último, hay que tomar en cuenta que la resistencia a este antimicrobiano está generalmente asociada a elementos genéticos móviles, los cuales contribuyen en la dispersión de genes de resistencia entre bacterias (Roberts y Schwarz, 2009), lo que podría generar un impacto en la salud pública.

Los porcentajes de resistencia a las cefalosporinas analizadas en esta investigación fueron en general bajas para cefoxitina, cefotaxima y cefepime. En lo que respecta a cefoxitina (cefalosporina de segunda generación), nuestros resultados fueron similares a los de Atterby y col., (2016), quienes identificaron una resistencia al cefadroxilo (cefalosporina de segunda) del 16% (n= 9/55) en gaviotas en Alaska.

Acerca de las cefalosporinas de tercera y cuarta generación (C y FE), los resultados fueron similares a los de Giacopello y col., (2016), quienes no observaron resistencia en este tipo de cefalosporinas en enterobacterias aisladas (n=11/55) de aves paseriformes silvestres en Italia. De igual forma Silva y col., (2009), determinaron un patrón de sensibilidad en todas las cepas de *E. coli* aisladas (n= 182) a partir de palomas del Brasil. De acuerdo con el estudio de Santos y col., (2013), de los aislados de *E. coli* (n= 28) en aves paseriformes y otras aves silvestres en Archipiélago de Azores en Portugal, ninguna fue resistente a cefoxitina, cefotaxima o ceftazidima.

Finalmente, el perfil fenotípico de resistencia para la ciprofloxacina y a

gentamicina en esta investigación, concuerda con los datos obtenidos por Gambino y col., (2021), quienes determinaron la RAM en diferentes especies de aves paseriformes (n=193). El perfil fenotípico de resistencia a la ciprofloxacina y gentamicina en los aislados de enterobacterias fue bajo, y específicamente en el caso de *E. coli*, la RAM para CI fue de 6% (n=1/15) y para GM del 0% (n= 0/15). De igual forma, Bonnedahl y col., (2008) reportaron una sensibilidad del 100% a la ciprofloxacina y gentamicina, en cepas de enterobacterias (n= 14/49) aisladas a partir de hisopados cloacales de pingüinos (*Pygoscelis papua*) en la Antártida.

Si revisamos otros estudios de RAM, realizados en las Islas Galápagos, los porcentajes de resistencia fenotípicos obtenidos para algunos de los antimicrobianos analizados en nuestra investigación, son similares a los obtenidos en otras especies animales, como iguanas y tortugas (Franco y col., 2011; Thaller y col., 2010; Wheeler y col., 2012). Por ejemplo, Wheeler y col., (2012), determinaron el porcentaje de RAM en cepas de *E. coli* (n= 59) aisladas de heces fecales de iguanas terrestres (*Conolophus subcristatus*), iguanas marinas (*Amblyrhynchus cristatus*), tortuga gigante (*Geochelone nigra*) y muestras de agua de mar. Ellos identificaron un 28% de resistencia a la ampicilina, 39% a tetraciclina, y 6% a trimetoprima sulfametoxazol; todas las cepas fueron sensibles a cefazolina, gentamicina, ciprofloxacina y cloranfenicol.

Así también, Thaller y col., (2010), identificaron patrones de sensibilidad de tipo silvestre (wild-type) en las enterobacterias dominantes o codominantes analizadas en iguanas terrestres (*Conolophus pallidus*) de la Isla de Santa Fe. Solamente 2 cepas aisladas de *E. coli*, fueron resistentes al ácido nalidíxico y a la gentamicina,

asociando la RAM a la toma muestras cercanas a zonas de acceso a pescadores. De esta manera, los investigadores concluyeron que la resistencia a los antimicrobianos, no se encontraría normalmente en un hábitat silvestre, a menos que existiera un impacto antropogénico mínimo y por tanto una presión de selección. Es así, que los estudios realizados en vida silvestre son importantes para la evaluación del impacto de los seres humanos en la RAM.

Se identificaron cepas de *E. coli* con perfil MDR, es decir, que presentaron resistencia a 3 o más clases de antimicrobianos. Estos resultados son comparables con los obtenidos por Atterby y col., (2016), quienes reportaron un 22% (n= 12/55) de cepas de *E. coli* MDR en gaviotas en Alaska; y con el estudio de Gambino y col., (2021), quienes encontraron aislamientos de cepas MDR en el 23% de las aves silvestres muestreadas (n= 6/26). El porcentaje de cepas bacterianas MDR en un ecosistema específico, se encuentra relacionado con un impacto antropogénico, es decir, con el contacto de aves silvestres con desechos humanos o de origen agropecuario (Skarżyńska y col., 2021). A su vez, estas aves, serían portadoras frecuentes de cepas bacterianas MDR y por tanto, asociadas con la RAM en el ambiente (Guenther y col., 2010). Es importante entender el rol que poseen las bacterias en el medioambiente como reservorios naturales de resistencia a los antimicrobianos y como fuente de elementos genéticos de resistencia (Chamosa y col., 2017); siendo importante determinar los mecanismos y la dispersión de la RAM a través de centinelas, como lo son las aves silvestres.

### **5.3. Resistencia genotípica a los antimicrobianos en *Escherichia coli***

#### **5.3.1. Genes de betalactamasas (*bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CMY</sub>)**

Con respecto a los genes que codifican a betalactamasas, no se identificó el gen *bla*<sub>CTX-M</sub> en el aislado con perfil fenotípico de resistencia a la cefotaxima. El resultado obtenido podría ser comparable con lo determinado por Silva y col., (2011), quienes identificaron este gen solo en el 0,5% (n= 1/220) de los aislados de *E. coli* procedentes de aves silvestres en el archipiélago de Azores en Portugal. Sin embargo, nuestras observaciones difieren de los resultados de Ahlstrom y col., (2018); Islam y col., (2021); Pinto y col.,(2010) quienes identificaron el gen *bla*<sub>CTX-M</sub> en el 11,1% (n= 3/27), 30,9% (n= 17/55) y 46,9% (n= 15/32) de las cepas de *E. coli* de aves silvestres de Alaska, Bangladesh y Portugal respectivamente.

El gen *bla*<sub>TEM</sub> fue el de mayor proporción en el estudio, entre los aislados de *E. coli* resistentes a la ampicilina. Estos resultados fueron mayores que los de Santos y col., (2013) y los de Veldman y col., (2013), quienes determinaron el gen en un 3,47% (n= 4/115) y un 3,1% (n= 2/65) de los aislados de *E. coli* en aves silvestres de Azores en Portugal y Países Bajos respectivamente. Por el contrario, Nowaczek y col., (2021), identificaron el gen *bla*<sub>TEM</sub> en el 100% (n= 9/9) de los aislados de *E. coli* resistentes a la ampicilina (n= 9/32).

El gen *bla*<sub>SHV</sub> también se determinó en esta investigación en cepas de *E. coli* resistentes a la ampicilina. En otros estudios, Atterby y col., (2016) y Bonnedahl y col., (2009), identificaron el gen en el 10,3% (n= 3/9) y 12,5% (n= 2/16) respectivamente, de cepas de *E. coli* de aves silvestres en Suecia y Francia. Los porcentajes son bajos, pero mayores que en nuestro estudio; es importante indicar, que las dos investigaciones se realizaron a partir de aislamientos caracterizados

fenotípicamente como cepas BLEE.

No se amplificó el gen *bla<sub>CMY</sub>* a partir de las cepas de *E. coli* aisladas de pinzones de Darwin. Este resultado se asemeja al de Ben Yahia y col., (2018) quienes no identificaron el gen *bla<sub>CMY</sub>* de cepas de *E. coli* con perfil fenotípico BLEE (n= 5/111) de aves silvestres en Túnez. Sin embargo, difieren del estudio de Skarzyńska y col., (2021), quienes pese a reportar un bajo porcentaje del gen, de 7,1% (n= 5/70) en cepas de *E. coli* de aves silvestres en Polonia, fue mayor al de esta investigación.

Cabe indicar, que se identificó el gen *bla<sub>TEM</sub>* en cepas *E. coli* de la zona agropecuaria y de la zona protegida de la Isla. El gen *bla<sub>SHV</sub>*, se lo determinó solamente en la zona protegida. No se registró la presencia de estos genes en la zona urbana del muestreo. Algunos estudios muestran un bajo porcentaje de cepas BLEE en aves paseriformes ( Silva y col., 2011; Santos y col., 2013;), por lo que al parecer estos genes se encontrarían en menor frecuencia en este tipo de aves. Esta particularidad podría deberse a la influencia en composición de la microbiota intestinal (Guenther y col., 2011).

Las betalactamasas de espectro extendido, son consideradas un problema significativo tanto en medicina humana, como en veterinaria (Guenther y col., 2011). Pese a que las betalactamasas de *bla<sub>CTX-M</sub>*, han sido comúnmente identificadas tanto en humanos (Li y col., 2011) como en animales (Ho y col., 2015) y en algunos estudios de aves silvestres (Atterby y col., 2017; Veldman y col., 2013), nosotros no las identificamos en pinzones de la Isla Santa Cruz. Las aves permiten evidenciar la actividad humana en el ambiente (Guenther y col.,

2011), por lo que los resultados de esta investigación, indicarían probablemente un bajo uso de cefalosporinas de tercera generación en las zonas estudiadas y por tanto una baja presión de selección en el ambiente natural de estas aves.

Se conoce que los genes que codifican para bacterias BLEE se encuentran frecuentemente en la microbiota de animales de producción (Smet y col., 2010). Es así que, en nuestro estudio, los genes que codifican para betalactamasas de tipo *bla*<sub>TEM</sub> y *bla*<sub>SHV</sub> se identificaron en la zona agropecuaria, y debido a su cercanía con esta, también en la zona protegida de la Isla. Estos resultados, podrían asociarse al uso de penicilinas sintéticas en animales; la presencia de antimicrobianos en granjas, aguas residuales y terrenos que utilizan abono de origen animal, podrían estar ejerciendo una presión de selección y por tanto una evolución hacia la RAM (Martinez, 2009). Por otro lado, las cepas de tipo BLEE se encuentran localizadas generalmente en plásmidos, transposones o integrones, lo que permitiría la transferencia horizontal de determinantes genéticos entre bacterias (Smet y col., 2010).

En lo que respecta a estudios realizados en Galápagos, Nieto y col., (2021), determinaron mediante PCR cuantitativa un panel de 21 genes de resistencia en muestras de heces fecales de tortugas gigantes (*Chelonoidis* spp.) (n= 200) de la Isla Santa Cruz e Isabela. Ellos identificaron 19 genes de resistencia (n= 19/21) y al menos uno se observó en cada muestra, siendo así que el gen *bla*<sub>TEM</sub> se reportó en un 33%. Por lo que estaríamos de alguna manera corroborando la circulación de este gen en la Isla Santa Cruz.

### 5.3.2. Gen de resistencia a la tetraciclina (*tetA*)

La resistencia a la tetraciclina en enterobacterias generalmente está asociada a la adquisición de genes que codifican para bombas de eflujo, como el gen *tetA* (Diren Sigirci y col., 2019; Handrova y Kmet, 2019). En este estudio, se identificó a *tetA*, en cepas de *E. coli* fenotípicamente resistentes a la tetraciclina. Estos resultados son similares a los reportados por Merkeviene y col., (2018), quienes identificaron a este gen en un 85% (n= 28/33) de las cepas de *E. coli* fenotípicamente resistentes a este antimicrobiano, en aves silvestres en Lituania. Por otro lado, Radhouani y col., (2012), identificaron el gen *tetA* en el 59,3% (n= 16/27) de cepas aisladas de águilas ratoneras de Portugal; pese a que la proporción fue baja, de la misma que manera que en nuestro estudio, el porcentaje fue elevado.

La alta proporción de este gen en la investigación, se podría deber a que generalmente se encuentran asociado a elementos móviles de las bacterias (Roberts y Schwarz, 2009); es por esto, que el alelo de este gen, se encontraría en un amplio rango de bacterias, dado a su transferencia a través de plásmidos conjugativos (Roberts y Schwarz, 2009).

A su vez, el gen *tetA* se registró en mayor proporción en la zona agropecuaria. Este resultado podría estar asociado a la crianza de aves que se práctica en dicha zona de la Isla, ya que este gen se lo ha relacionado con cepas de aves de corral fenotípicamente resistentes a la tetraciclina (Nowaczek y col., 2021; Vuthy y col., 2017).

### 5.3.3. Genes de resistencia a la colistina

La colistina es un antimicrobiano utilizado como último recurso de tratamiento para bacterias gramnegativas MDR (Aghapour y col., 2019). Existen estudios que identifican a las aves silvestres como posibles reservorios de genes *mcr* de resistencia a la colistina (Ahmed y col., 2019; Ruzauskas y Vaskeviciute, 2016); razón por la cual, las aves podrían ser importantes, en la diseminación de bacterias que codifican para estos genes (Anyanwu y col., 2020).

La diseminación de cepas resistentes a la colistina podría estar relacionado a su uso como promotor de crecimiento en ganado (Yamamoto y col., 2019), sin embargo actualmente en el Ecuador, se encuentra prohibida su utilización en animales (Agrocalidad, 2019).

En esta investigación, no se determinó la presencia de genes de resistencia a la colistina (*mcr-1* a *mcr-5*) en las cepas de *E. coli* analizadas en pinzones. Estos datos concuerdan con las investigaciones de Atterby y col., (2016) y Carvalho y col., (2020), quienes no identificaron el gen *mcr-1* en gaviotas de Alaska, ni en buitres de las Islas Canarias respectivamente.

Pese a que en el Ecuador, se ha reportado la presencia del gen *mcr-1* en aves domésticas, cerdos, y mascotas (Loayza y col., 2020; Ortega y col., 2016; Yamamoto y col., 2019), no se han reportado los genes *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* o *mcr-5* (Loayza y col., 2020). Nuestro hallazgo podría indicar, que estos genes no están circulando en la Isla Santa Cruz, lo cual se podría corroborar, con lo observado por Nieto y col., (2021), quienes no determinaron la presencia del gen *mcr-1* en muestras de heces fecales de tortugas.

#### 5.4. Resistencia fenotípica a los antimicrobianos en *Enterococcus* spp.

Los *Enterococcus*, son bacterias que forman parte de la microbiota intestinal normal de humanos y animales (García y col., 2022). Además, debido a la resistencia intrínseca que poseen para algunos antimicrobianos de uso común, y la gran capacidad que tienen de adquirir genes de resistencia, este género posee una gran importancia en la clínica de enfermedades infecciosas (Kristich y col., 2014).

Dado a que, los animales silvestres permiten entender los mecanismos de la RAM en diversas fuentes ambientales (Ramey y Ahlstrom, 2020), es importante identificar los mecanismos, a través de bacterias centinelas como los *Enterococcus*. En este sentido, las aves silvestres pueden actuar como vectores de este tipo de bacterias (Klibi y col., 2015). Existen algunos estudios enfocados en la resistencia a los antimicrobianos en cepas de *Enterococcus* aislados de aves silvestres (Ben Yahia y col., 2018; Hathcock y col., 2019; Santos y col., 2013), sin embargo este sería el primer reporte en pinzones de las Islas Galápagos.

En esta investigación, se registró un porcentaje de cepas de *Enterococcus* spp. que no presentó resistencia fenotípica a ninguno de los antimicrobianos analizados. La tetraciclina fue el único antimicrobiano en el que se identificó una resistencia mayor al 7%, y esta se encontró en mayor proporción en la zona agropecuaria de la Isla. Estos datos, son similares a los de Radimersky y col., (2010) quienes identificaron una alta resistencia a la tetraciclina, siendo esta del 20% (n= 28/143) en cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de palomas ferales de la República Checa. De igual forma, Klibi y col., (2015), reportaron una resistencia a este antimicrobiano en el 19,2% (n= 11/27) de aislados de *Enterococcus* provenientes

de aves silvestres en Túnez. Los resultados podrían estar asociados, a la presión de selección ejercida por un posible uso de tetraciclina en animales, sobre todo en aves de corral que se encuentran en esta zona (Ben Yahia y col., 2018; Schell, 2018); también se debe tener en cuenta, que la transferencia de determinantes genéticos de resistencia a la tetraciclina a través de elementos móviles como transposones conjugativos, podría ser un factor importante a tomar en cuenta en la resistencia de este antimicrobiano (Schell, 2018).

La resistencia a la estreptomicina en esta investigación fue baja, sin embargo, existen otros estudios que informan una menor resistencia. Tal es el caso de Santos y col., (2013), quienes reportaron un 0% (n=0/138) de resistencia a este antimicrobiano en aislados de *Enterococcus* de aves silvestres en el archipiélago de Azores en Portugal. También, Ben Yahia y col., (2018), determinaron una resistencia del 2,5% (n= 2/79) en cepas de *Enterococcus* de diversas aves silvestres en Túnez. Al igual que para la tetraciclina, se observó en esta investigación, una mayor proporción de la resistencia a la estreptomicina en la zona agropecuaria.

La ciprofloxacina fue el tercer antimicrobiano en presentar una mayor RAM en cepas de *Enterococcus* aislada de pinzones y se determinó en mayor proporción en la zona agropecuaria de la Isla. Estos resultados difieren a lo identificado por Hathcock y col., (2019), quienes no observaron resistencia a este antimicrobiano (n= 0/76) en cepas de *Enterococcus faecalis* aislados de aves silvestres rapaces en el Sudeste de los Estados Unidos. Sin embargo, otros estudios como los de Radhouani y col., (2012) y el de Vuthy y col., (2017) reportaron resistencias más

altas de entre el 29% (n= 9/31) y el 41% (n= 30/73) en cepas de *Enterococcus* spp. aislados de aves silvestres en Portugal y Túnez respectivamente.

Las resistencias a la estreptomicina y ciprofloxacina, pese a que fueron bajas, podría asociarse a un posible uso en baja cantidad, de estos antimicrobianos en el ambiente agropecuario (García y col., 2022). Cabe destacar, que las quinolonas poseen una actividad moderada contra los *Enterococcus*, y generalmente ha sido observada en aislados clínicos (Kristich y col., 2014), lo cual no sería el caso de esta investigación, dado a que la resistencia fue mínima en la zona urbana de la Isla.

Los resultados de resistencia a la vancomicina y teicoplanina en esta investigación fueron bajos y son similares a los obtenidos en otros estudios. Este es el caso del estudio de Santos y col., (2013), en los que reportan porcentajes del 0,7% (n= 1/138) para los dos antimicrobianos. Por otro lado, Radhouani y col., (2012) no observaron resistencia a estos antimicrobianos 0% (n= 0/31). Existen otros reportes como el de Ben Yahia y col., (2018), quienes pese determinar resistencias del 6.3% (n= 5/79) y 2,5% (n= 2/79) para vancomicina y teicoplanina, igual se presentaron en baja proporción. Las aves silvestres podrían adquirir bacterias resistentes a los antimicrobianos a través de su exposición con el área que les rodea (Radhouani y col., 2012b), por lo que el identificar una baja resistencia a la vancomicina y teicoplanina, nos estaría indicando la no circulación de este mecanismo de RAM en el ambiente.

La ampicilina en este estudio fue uno de los antimicrobianos en los que se observó menor resistencia en pinzones de Darwin. En este contexto, Radimersky y col.,

(2010) hallaron una resistencia a la ampicilina del 2,8% (n= 4/143) en cepas de *Enterococcus* aislados de aves silvestres en la Republica Checa. A su vez, Marrow y col., (2009); Klibi y col., (2015); Hathcock y col., (2019), determinaron un 0% de resistencia a este antimicrobiano en aves silvestres en Estados Unidos y África. Por lo que podríamos decir que en general esta resistencia puede ser baja en este tipo de aves, y podría estar relacionada con las especies de *Enterococcus* presentes en la microbiota intestinal de estas aves (Stępień y col., 2019).

Generalmente la RAM en *Enterococcus* aislados del tracto intestinal de aves silvestres, ha estado asociado a la especie *E.faecium*, y en menor proporción a otras especies tales como, *E.casseliflavus*, *E.durans*, *E.hirae*, entre otros (Santos y col., 2013; Stępień-Pyśniak y col., 2019). Pese a que el objetivo de esta investigación no fue el de tipificar las especies de *Enterococcus* en pinzones, dado a su perfil de sensibilidad, se podría inferir que la mayoría de cepas aisladas no pertenecerían a la especie *E.faecium* (Radhouani y col., 2012) . Estos datos también se podrían asociar, con el bajo porcentaje de resistencia encontrada a la ampicilina en esta investigación. *Enterococcus* suele ser frecuentemente resistente a este antimicrobiano (García y col., 2022). Sin embargo, la resistencia intrínseca de los *Enterococcus*, así como la extensión de la sensibilidad a diferentes clases de betalactámicos, estaría también asociada a la especie de la bacteria (Kristich y col., 2014). Por otro lado, la resistencia adquirida a los antimicrobianos obtenida a través de elementos móviles o a través de la exposición al antimicrobiano, también estaría relacionada con la especie de *Enterococcus* (Kristich y col., 2014).

El cloranfenicol y la gentamicina analizadas en esta investigación presentaron resistencias bajas, de manera similar a las reportadas en aislados de *Enterococcus* de aves silvestres en Polonia por Stępień y col., (2019). Los investigadores observaron una resistencia al cloranfenicol del 0% (n= 0/27) y a la gentamicina del 3,37% (n= 1/27). Por otro lado, los datos de esta investigación también difieren un poco con los identificados por Ben Yahia y col., (2018), quienes pese a hallar una baja RAM para estos antimicrobianos, estas fueron mayores que en nuestro estudio, observando el 8.8% (n= 7/79) de RAM para cloranfenicol y 3,8% (n= 3/79) para la gentamicina respectivamente.

La RAM observada en estas cepas en términos generales, fue baja y se asemeja a la de otras investigaciones realizadas en aves silvestres (Radimersky y col., 2010; Santos y col., 2013)

Finalmente, en este estudio, se determinó un bajo porcentaje de cepas MDR, por lo cual se podría inferir, que los pinzones no serían reservorios potenciales de cepas de *Enterococcus* multiresistentes en las Islas Galápagos.

## **5.5. Perfil de resistencia genotípica a los antimicrobianos en *Enterococcus* spp.**

### **5.5.1. Resistencia a la vancomicina (*vanA*)**

La vancomicina es considerada un antimicrobiano de último recurso para el tratamiento de infecciones severas causadas por cocos grampositivos (Stogios y Savchenko, 2020). La resistencia a este antimicrobiano, se ha reportado en plásmidos o transposones en diferentes especies de *Enterococcus* (Stogios y

Savchenko, 2020). Esta, se manifiesta principalmente a través de genes llamados *van*, los cuales actúan a nivel de la biosíntesis de la pared celular (Binda y col., 2014).

Los mecanismos de resistencia a la vancomicina en *Enterococcus* (VRE) en humanos y animales, se asocian principalmente a los genes *vanA* o *vanB*, (Ben Yahia y col., 2018). En aves silvestres, se ha determinado la presencia de estos genes en algunos estudios (Ben Yahia y col., 2018; Radimersky y col., 2010; Santos y col., 2013). Sin embargo, en esta investigación no se identificó el gen *vanA* en los aislados de *Enterococcus* spp. con perfil fenotípico de resistencia a la vancomicina.

Los estudios en los que se han identificado los genes *vanA* y B en aves silvestres, principalmente han sido realizados a partir de cepas de *Enterococcus faecium* y *faecalis* (Oravcova y col., 2016; M. Roberts y col., 2016; Santos y col., 2013). Por lo que se podría inferir, que en nuestra investigación no se habrían aislado estas especies de *Enterococcus* en pinzones. Sin embargo, ya que la caracterización de *Enterococcus*, no fue un objetivo de esta investigación, se recomienda tipificarlas en futuros estudios y determinar si existe una relación entre la especie y la presencia del gen *vanA* en pinzones.

En este estudio, no se realizó la identificación de otros genes *van*, sin embargo, las cepas fenotípicamente resistentes podrían pertenecer al fenotipo VanC, el cual es un gen de resistencia intrínseca que se ha descrito en especies de *Enterococcus casseliflavus* y *gallinarum*; además las cepas suelen ser susceptibles también a teicoplanina (Jhonson y col., 1990), lo cual va acorde con algunas de las cepas

fenotípicamente resistentes a la vancomicina en pinzones. El gen *vanB* se ha identificado en humanos en Europa y a nivel mundial no es común encontrarlo en animales (Ben Yahia y col., 2018); sin embargo estudios posteriores podrían confirmar estos datos en pinzones.

No existen estudios en Galápagos que hayan investigado la presencia de este gen en las Islas.

### **5.5.2. Gen de resistencia a la tetraciclina (*tetM*)**

Las tetraciclinas, son un grupo de antimicrobianos de amplio espectro que actúan inhibiendo la síntesis proteica tanto de bacterias gramnegativas como grampositivas (Aminov y col., 2001). La resistencia a este antimicrobiano, está dada por los genes *tet* (Chopra y Roberts, 2001). El gen *tetM* es uno de los principales genes de resistencia a la tetraciclina, relacionado a la protección ribosomal. Este gen, se encuentra en elementos conjugativos como transposones, lo que ayuda a la dispersión de la RAM en bacterias como los *Enterococcus* (Frazzon y col., 2010).

En este estudio se identificó el gen *tetM* en cepas de *Enterococcus* spp. fenotípicamente resistentes a la tetraciclina. Estos resultados son similares a los obtenidos por Radimersky y col., (2010), quienes determinaron el gen *tetM* en el 78% (n= 16/28) cepas de *Enterococcus* aislados de palomas ferales en la República Checa. Al contrario, otras investigaciones como las de (Ben Yahia y col., 2018; Santos y col., 2013; Stępień y col., 2019), quienes registraron porcentajes mayores en relación a la presencia del gen *tetM* en cepas de *Enterococcus* en aves silvestres de Túnez, Portugal y Polonia. Estas fueron del

89,2% (n= 33/37), 92,5% (n= 37/40) y 90,9% (n= 10/11) respectivamente. En este trabajo se encontró una mayor proporción del gen *tetM* en la zona agropecuaria (72,2%), lo cual podría asociarse el amplio uso de la tetraciclina en medicina veterinaria, siendo su presencia en el medio ambiente bastante extendido (Marosevic y col., 2017). En el caso específico de esta investigación, en la zona agropecuaria de la Isla Santa Cruz, existen algunas explotaciones avícolas, por lo que, dado al amplio uso de este antimicrobiano en aves (Schell, 2018), el hallazgo podría estar relacionado con este factor. A su vez, el estudio de Nieto y col., (2021), determinó un alto porcentaje de genes *tet* (97,2%), entre ellos *tetM* (35,5%) en muestras fecales de tortugas gigantes (*Chelonoidis* spp.) en la Isla Santa Cruz. Los investigadores en su estudio concluyeron, que una alta resistencia a este antimicrobiano podría estar relacionado a su uso en animales de acuerdo con datos que obtuvieron a nivel local.

Finalmente, se podría concluir que las aves silvestres de Galápagos, como los pinzones serían centinelas de la RAM, al poder determinar entre ellos, una potencial contaminación ambiental con bacterias resistentes

## **5.6. Resistencia a los antimicrobianos en *Enterobacter* spp.**

### **5.6.1. Resistencia fenotípica a los antimicrobianos en *Enterobacter* spp.**

En este estudio se identificó el porcentaje de resistencia fenotípica y genotípica de *Enterobacter* spp., pese a no haber sido un objetivo primario de esta investigación. Este género bacteriano se aisló en mayor proporción en relación a *E.coli* en pinzones de Darwin, por lo cual se la analizó como posible bacteria

centinela de RAM en estas aves en Galápagos.

Los *Enterobacter* spp., son bacterias que se encuentran ampliamente distribuidas en el ambiente, así también como en la microbiota intestinal de humanos y otros animales (Mezzatesta y col., 2012). Además son importantes agentes causales de infecciones nosocomiales y comunitarias (Bouza, 2002); es debido a estas características, que *Enterobacter* spp. permitiría el análisis de determinación de patrones de presión selectiva de los antimicrobianos en el ambiente (Torres, 2012).

Se observó en esta investigación, un mayor porcentaje de resistencia para ampicilina y cefoxitina. Otros estudios realizados en aves silvestres (Foti y col., 2017a; Giacobello y col., 2016) han reportado porcentajes de resistencia a la ampicilina en enterobacterias, del 63% (n= 77/122) y del 52% (n=43/83) respectivamente. Cabe destacar que los investigadores, no aislaron diversas cepas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*; sin embargo, observaron un aislamiento de *Enterobacter* spp. del 29,5% (n=36/122) en aves paseriformes, y la resistencia a la ampicilina en este género fue del 88,9% (n= 32/36). Cabe indicar, que *Enterobacter* spp. posee un fenotipo de cefalosporinasa AmpC inducible codificada cromosómicamente (Jacoby, 2009; Ruppé y col., 2015); lo cual hace que esta bacteria sea intrínsecamente resistente a la ampicilina, amoxicilina, amoxicilina clavulanato, cefalosporinas de primera generación y cefoxitina (Bouza, 2002). Estas betalactamasas de tipo AmpC son importantes clínicamente (Jacoby, 2009) ya que dificultan el tratamiento de este patógeno debido a que no solo las hace resistentes a los betalactámicos mencionados, sino que bajo presión

de selección con estos antimicrobianos, este microorganismo desarrolla resistencia inclusive a cefalosporinas de tercera generación y monobactámicos (Hilty y col., 2013).

En este contexto, en este estudio se observó un porcentaje de resistencia intermedio a la cefotaxima y al cefepime. Por el contrario, Foti y col., (2017), reportaron un alto porcentaje de resistencia a la cefotaxima, siendo esta del 76,9% (n=10/13) en cepas de *Enterobacter* spp. de aves passeriformes en Italia. Estos resultados podrían estar asociados a una sobre expresión de enzimas de tipo AmpC inducibles, lo cual conferiría resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación (Bouza, 2002; Jacoby, 2009). Cabe concluir, que la resistencia de *Enterobacter* a las cefalosporinas de tercera generación ha incrementado debido al uso cada vez más frecuente de estos antimicrobianos desde su introducción (Paterson, 2006).

Por otro lado, se registró resistencia a la ciprofloxacina, a la gentamicina y a la trimetoprima sulfametoxazol. Estos resultados fueron similares a los de Ben Yahia y col., (2020), quienes reportaron una resistencia a la ciprofloxacina del 8% (n= 8/99), a gentamicina del 6% (n= 6/99) y del 3% (n= 3/99) para trimetoprima sulfametoxazol en cepas de enterobacterias aisladas de aves silvestres en Túnez. La mayoría de aislados de *Enterobacter* spp. suelen ser sensibles a estos 3 antimicrobianos (Bouza, 2002), lo que explicaría los bajos porcentajes de RAM encontrados en estos estudios.

De la misma manera, fueron bajos los porcentajes de resistencia a la tetraciclina y al cloranfenicol. Sin embargo, estos resultados difieren de los de Gibbs y col.,

(2007), quienes registraron un 0% (n= 0/ 25) de resistencia a la tetraciclina y un 8% (n= 2/25) al cloranfenicol en cepas de enterobacterias aisladas de mirlos en los Estados Unidos. También difieren de otras investigaciones realizadas en aislados de *E.coli*, como el de Santos y col., (2013), quienes en el Archipiélago de Azores en Portugal, identificaron una resistencia total a la tetraciclina del 4,34% (n= 5/11) y del 0% (n= 0/115) al cloranfenicol en cepas de aves silvestres.

En este estudio los porcentajes de RAM también variaron entre las cepas de *E.coli* y las de *Enterobacter* aisladas en pinzones. Esto se puede deber a la diferencia en proporción entre los aislados de las dos enterobacterias y son similares a los de Rose y col., (2009), quienes determinaron en los Estados Unidos, un porcentaje de RAM del 14% en *E.coli* versus un 92% para *Enterobacter*, en aislados de animales silvestres, entre los que se encontraban aves, Se podría concluir que la resistencia a los antimicrobianos también podría variar entre diferentes grupos taxonómicos dentro de un mismo ambiente (Rose y col., 2009). Es por esto que sería importante la inclusión de otras enterobacterias como centinelas de RAM en diversos ambientes, permitiendo identificar los mecanismos de resistencia circulantes en el ambiente, de mejor manera.

Finalmente, se observaron cepas de *Enterobacter* spp. MDR, en similar porcentaje al identificado en *E.coli*. Estos resultados confirmarían que las aves pueden ser portadoras y diseminadoras de genes de resistencia antimicrobiana en el ambiente (Skarżyńska y col., 2021).

### 5.6.2. Resistencia genotípica a los antimicrobianos en *Enterobacter* spp.

En este estudio, se determinó los genes que codifican para betalactamasas ( $bla_{CTX-M}$ ,  $bla_{TEM}$ ,  $bla_{SHV}$  y  $bla_{CMY}$ ), tetraciclina ( $tetA$ ) y colistina ( $mcr-1$  a  $mcr-5$ ), en cepas de *Enterobacter* spp. aisladas de pinzones. En lo que respecta a los genes de resistencia a los betalactámicos, es importante considerar que el reporte de estos en enterobacterias, ha ido en aumento tanto en humanos como otros animales (Smet y col., 2010). En el género *Enterobacter*, la producción de betalactamasas, es el principal mecanismo de resistencia, producido por enzimas de las 4 clases moleculares de Ambler (A, B, C y D) (Mezzatesta y col., 2012). Es además importante considerar, que *Enterobacter* spp., produce una betalactamasa de tipo AmpC constitutiva, siendo capaz de sobre-producir este tipo de betalactamasas por depresión genética cromosómica o por la adquisición de genes a través de elementos móviles bacterianos (Mezzatesta y col., 2012).

En este estudio, se identificaron los genes  $bla_{CTX-M}$ ,  $bla_{TEM}$ ,  $bla_{SHV}$  y  $bla_{CMY}$  en cepas de *Enterobacter* spp. con resistencia fenotípica a la cefotaxima o ampicilina respectivamente. Estos resultados difieren de los resultados de Miller y col., (2020), quienes no identificaron los genes  $bla_{CTX-M}$  y  $bla_{SHV}$  en cepas de enterobacterias aisladas de búhos en Estados Unidos; sin embargo, son similares con respecto al porcentaje registrado de  $bla_{TEM}$  del 7% (n= 6/78) y  $bla_{CMY}$  del 1,3% (n= 1/78). La diferencia podría estar influenciada por el número de muestras analizadas. Los resultados de este estudio difieren de los reportados por Poirel y col., (2012) en 10 cepas de enterobacterias con perfil fenotípico BLEE, aisladas

de gaviotas y pelícanos en Miami, Estados Unidos. Los investigadores, identificaron a un 20% (n= 2/10) como *Enterobacter cloacae*, y de estas cepas, el 100% (n= 2/10) amplificó el gen *bla<sub>SHV</sub>*.

Por el contrario, Oteo y col., (2018), identificaron a *Enterobacter* spp. en el 8,5% (n= 8/94) de cepas de enterobacterias con fenotipo BLEE, aisladas de aves silvestres en España. Ellos, determinaron la presencia del gen *bla<sub>CTX-M</sub>* en el 25% (n= 2/8) de los aislados correspondientes a este género.

Cabe destacar que no existe un estudio que analice específicamente la proporción de genes productores de betalactamasas en *Enterobacter* spp. La mayoría de estudios realizan una selección de enterobacterias con fenotipo BLEE, razón por la cual los datos difieren de los hallados en este estudio.

Estos resultados en pinzones son relevantes, dada la importancia de las betalactamasas en la clínica, así como la facilidad de transferencia de estos genes a través de elementos genéticos móviles (Smet y col., 2010). Los genes *bla<sub>CTX-M</sub>* en estas aves estaría circulando en la zona agropecuaria de la Isla Santa Cruz en Galápagos.

La resistencia a la tetraciclina en la mayoría de las bacterias se debe a la adquisición de determinantes genéticos a través de elementos móviles. Entre los mecanismos asociados a la RAM en tetraciclina, están las bombas de eflujo, y los genes como *tetA*, suelen ser los más comunes en bacterias gramnegativas (Roberts, 2005).

En este trabajo se identificó el gen de resistencia a la tetraciclina (*tetA*) en cepas

de *Enterobacter* spp., fenotípicamente resistentes a este antimicrobiano. Estos resultados difieren de los estudios de Sigirci y col., (2019) y Miller y col., (2020), quienes determinaron el gen *tetA* en el 6,1% y 6,4% de cepas de enterobacterias aisladas de aves silvestres en Estambul y Estados Unidos respectivamente. Los dos estudios basaron su análisis, en la identificación del gen *tetA* en bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y no solo en *Enterobacter* como en nuestra investigación; pudiendo inferir que la diferencia de porcentajes entre los dos estudios, estaría asociado al taxón bacteriano (Rose y col., 2009). Por otro lado, también podría ser, que otros genes importantes, asociados a bombas de eflujo, tales como *tetB*, *tetC*, *tetD* o *tetG* serían responsables de la RAM observada (Belaynehe y col., 2018). Teniendo en cuenta que este no fue un objetivo inicial de este estudio, se requieren nuevos análisis para corroborar esta hipótesis.

Finalmente se analizó la presencia de los genes de resistencia a la colistina (*mcr-1* a *mcr-5*) en las cepas de *Enterobacter* spp. aisladas de pinzones, sin embargo, todas las cepas fueron negativas. Cabe señalar que la resistencia a la colistina en *Enterobacter* spp., suele ser inusual en este género bacteriano (<1%) (ANLIS Malbrán, 2014). Además, los resultados de este estudio son similares a los reportados en la Isla Santa Cruz en tortugas gigantes (*Chelonoidis* spp.), donde no se amplificó el gen *mcr-1* en ninguna de las muestras colectadas (Nieto y col., 2021).

### **5.7. Análisis de clonalidad por PFGE**

El análisis mediante PFGE en este estudio, no pudo demostrar clonalidad entre las cepas circulantes en la Isla. Solamente 2 de 8 cepas de la zona agropecuaria y 2 de

7 de la zona protegida presentaron patrones de bandas indistinguibles entre sí. La existencia de una amplia diversidad genética en los aislados analizados, podría estar relacionada con la diversidad en la composición de su microbiota intestinal.

Los pinzones son aves que suelen adaptarse a diferentes nichos ecológicos (Michel y col., 2018) y que adecuan su alimentación dependiendo del lugar en donde habitan. Pese a que la dieta de los pinzones terrestres (*Geospiza* spp.), se basa principalmente en el consumo de semillas, suelen ser oportunistas y alimentarse de lo que se encuentre a mayor disposición (Knutie y col., 2019). En este sentido, la microbiota de los pinzones también presenta variaciones asociadas a la presencia o no de humanos, por lo que esta podría diferir entre zona geográfica y entre especies hospederas (Knutie y col., 2019).

Además, las cepas analizadas en este estudio fueron tomadas durante las dos estaciones climáticas de la Isla. En este contexto, se conoce que la microbiota intestinal de los pinzones podría variar entre las estaciones seca y húmeda, asociando estos cambios, a la composición de su dieta (Knutie y col., 2019).

La falta de clonalidad entre las cepas de *E. coli* en esta investigación, podría estar relacionada también con una diversidad en proteobacterias de pinzones asociada a las características ecológicas y metabólicas de las aves (Ettema y Andersson, 2009). Los investigadores en su estudio determinaron que la diferencia en el tamaño del genoma de  $\alpha$ -proteobacterias, era un reflejo de la adaptación a diferentes ambientes. Sin embargo, no se descarta que mediante técnicas de menor poder discriminatorio como Tipificación de Secuencia Multilocus (MLST) o secuenciación de genomas completos (WGS) pueda demostrarse el origen común

de las mismas.

En cuanto a los patrones de resistencia similares en los distintos aislados, podrían deberse a la diseminación horizontal de determinantes de resistencia mediante elementos genéticos móviles como plásmidos o transposones.

La resistencia a los antimicrobianos es considerada un problema de salud pública global, la cual puede ser controlada a través de una mirada interseccional primando el concepto de “Una Sola Salud”. Es así, que en este estudio se identificó a la RAM a través de un análisis medioambiental, enfocado a un nicho ecológico único como lo son las Islas Galápagos. Los pinzones de Darwin han sido estudiados como modelo de radiación adaptativa, por lo que además de tomar esta característica importante de los pinzones para el análisis, se suma el hecho de que al ser un ave silvestre podría ser considerada como una posible centinela del mecanismo de la RAM en las Islas.

En este contexto, se determinó los perfiles fenotípicos y determinantes genéticos de resistencia de algunos de los antimicrobianos incluidos dentro de la lista de importancia crítica de la OMS. Los resultados obtenidos, de alguna manera nos llevan a pensar que existiría un impacto antropogénico indirecto asociado con las prácticas agropecuarias llevadas a cabo en la Isla Santa Cruz. La tetraciclina fue uno de los antimicrobianos con alto porcentaje de resistencia en cepas de *E.coli* y *Enteroccus* spp. aislados de la zona agropecuaria de la Isla. Este es un antimicrobiano utilizado frecuentemente en veterinaria, tanto en ganado como en aves. De acuerdo con el estudio de Nieto y col., (2021), la doxiciclina sería uno de los antimicrobianos más utilizados en animales domésticos en el mundo, por lo

que su hallazgo estaría asociado a un patrón de presión de selección y posible transferencia a través de elementos genéticos móviles.

Se identificaron determinantes genéticos importante de RAM no solo en las bacterias indicadoras seleccionadas inicialmente, sino también en cepas aisladas de *Enterobacter* spp. Este género bacteriano fue aislado en mayor proporción en pinzones en relación a *E.coli*, y se observaron otros perfiles de resistencia y determinantes genéticos. Es por esta razón, que se propone a *Enterobacter* spp. como una posible bacteria indicadora en pinzones para futuros estudios.

Por otro lado, no se determinó clonalidad entre las cepas de *E. coli* seleccionadas, lo que estaría asociado a la diversidad de su microbiota intestinal debido a factores como la dieta, clima entre otros, como el impacto humano en su alimentación. Sin embargo, entendemos, que se requieren de análisis con herramientas moleculares que posean un menor poder discriminatorio para llegar a una conclusión.

Se conoce que la población de las Islas ha aumentado en el último tiempo, sin embargo, no se sabe exactamente cuál sería su impacto en Galápagos. Se requieren de estudios posteriores que determinen si existe un impacto antropogénico directo de la RAM en las Islas, así como la identificación de elementos genéticos móviles como responsables de resistencia a los antimicrobianos en este ecosistema.

Existen algunos estudios fenotípicos y genotípicos de resistencia a los antimicrobianos realizados en las Islas Galápagos, sin embargo, todos ellos se han enfocado en réptiles y en muestras de agua. Este sería el primer estudio realizado

en aves silvestres de las Islas Galápagos.

## 6. CONCLUSIONES

- Se logró aislar e identificar cepas de *E. coli* y *Enterococcus* spp. en muestras de hisopados cloacales de pinzones de Darwin (*Geospiza* spp.) correspondientes a tres zonas georeferenciadas de la Isla Santa Cruz. En *E. coli*, el 19% de los aislamientos correspondió a la zona urbana, el 47% a la zona agropecuaria y el 34% a la zona protegida. Por otro lado, en *Enterococcus*, el 41% de las cepas identificadas correspondió a la zona urbana, el 34% a la zona agropecuaria y 25% a la zona protegida de la Isla.
- Se determinó fenotípicamente los perfiles de resistencia a antimicrobianos de importancia crítica propuestos en el estudio, en cepas aisladas de *E. coli*. Es así, que el 50% de las cepas fue resistente a la ampicilina, el 31,6% a la tetraciclina, el 18,4% a trimetoprima sulfametoxazol, el 14,7% a cloranfenicol, el 11,1% a la cefoxitina, el 6,6% a la ciprofloxacina, el 0,7% a la cefotaxima y cefepime y el 0% a la gentamicina.
- Se determinó fenotípicamente los perfiles de resistencia a los antimicrobianos de importancia crítica propuestos en el estudio, en cepas aisladas de *Enterococcus* spp. En este contexto, el 19,58% de las cepas fue resistente a la tetraciclina, el 6,93% a la estreptomicina, 5,72% a la ciprofloxacina, 2,41% a la vancomicina, 1,81% a la ampicilina y cloranfenicol, 1,20% a la gentamicina y teicoplanina.
- Se identificaron determinantes genéticos de resistencia a las betalactamasas en cepas de *E. coli*, a excepción del gen *bla<sub>CTX-M</sub>*.

- Se identificaron determinantes genéticos de resistencia a la tetraciclina (*tetA*) en cepas de *E. coli* fenotípicamente resistentes a la tetraciclina.
- No se determinó la presencia de genes de resistencia a la colistina (*mcr-1* a *mcr-5*) en cepas de *E. coli*.
- No se identificó la presencia del gen de resistencia *vanA*, en los aislados de *Enterococcus* spp. con perfil fenotípico de resistencia a la vancomicina.
- La resistencia encontrada en este estudio podría estar asociada a un impacto antropogénico asociado con la actividad agropecuaria de la zona.
- No se observó clonalidad en las cepas de *E. coli* seleccionadas, posiblemente debido a la diversidad en la microbiota intestinal de los pinzones.
- Este estudio propone a los pinzones de Darwin como posibles centinelas de resistencia antimicrobiana en las Islas Galápagos, considerando la importancia de las aves silvestres en el entendimiento de los mecanismos de RAM circulantes en el ambiente.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Aghapour Z, Gholizadeh P, Ganbarov K, Bialvaei A.Z, Mahmood S, Tanomand A, Yousefi M, Asgharzadeh M, Yousefi B, Kafil H. Molecular mechanisms related to colistin resistance in enterobacteriaceae. *Infect. Drug Resist.* 2019; 12, 965–975. <https://doi.org/10.2147/IDR.S199844>
2. Agrocalidad. Agrocalidad Prohíbe el uso del Antibiótico Colistina en Animales. Ecuador, 2019. [WWW Document]. URL <https://www.agrocalidad.gob.ec/agrocalidad-prohibe-el-uso-del-antibiotico-colistina-en-animales/>
3. Ahlstrom C, Bonnedahl J, Woksepp,H, Hernandez J, Olsen B, Ramey A. Acquisition and dissemination of cephalosporin-resistant *E. coli* in migratory birds sampled at an Alaska landfill as inferred through genomic analysis. *Sci. Rep* 2018; 8, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25474-w>
4. Ahmed Z, Elshafiee E, Khalefa H, Kadry M, Hamza D. Evidence of colistin resistance genes (*mcr-1* and *mcr-2*) in wild birds and its public health implication in Egypt. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 2019; 8, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0657-5>
5. Allen H, Donato J, Wang H, Cloud-Hansen K, Davies J, Handelsman J.

- Call of the wild: Antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010; 8, 251–259. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2312>
6. Allocati N, Masulli M, Alexeyev M, Di Ilio C. *Escherichia coli* in Europe: An overview. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2013; 10, 6235–6254. <https://doi.org/10.3390/ijerph10126235>
  7. Alonso C, de Toro M, de la Cruz F, Torres C. Genomic insights into drug resistance and virulence platforms, CRISPR-Cas systems and phylogeny of commensal *E. coli* from wildlife. *Microorganisms.* 2021; 9, 1–23. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050999>
  8. Asociación de Municipalidades Ecuatorianas (AME). Plan de desarrollo y ordenamiento territorial-Santa Cruz (Galapagos). Ecuador, 2011. [https://www.gobiernogalapagos.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2013/08/PDOT-Santa-Cruz-2012\\_2\\_primero.pdf](https://www.gobiernogalapagos.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2013/08/PDOT-Santa-Cruz-2012_2_primero.pdf)
  9. Aminov R, Garrigues-Jeanjean N, Mackie R. Molecular ecology of tetracycline resistance: Development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67, 22–32. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.22-32.2001>

10. Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud “Dr. Carlos Malbrán”(ANLIS Malbrán). Ficha Técnica Enterobacter spp. Argentina, 2014.  
<http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wpcontent/uploads/2020/12/Enterobacter-spp.pdf>
11. Anyanwu M, Jaja I, Nwobi O. Occurrence and characteristics of mobile colistin resistance (Mcr) gene-containing isolates from the environment: A review. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2020; 17, 1–38.  
<https://doi.org/10.3390/ijerph17031028>
12. Atterby C, Börjesson S, Ny S, Järhult J, Byfors S, Bonnedahl J. ESBL-producing *Escherichia coli* in Swedish gulls—A case of environmental pollution from humans? *PLoS One.* 2017; 12, 1–13.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190380>
13. Atterby C, Ramey A, Hall G, Järhult J, Börjesson S, Bonnedahl J. Increased prevalence of antibiotic-resistant *E. coli* in gulls sampled in Southcentral Alaska is associated with urban environments. *Infect. Ecol. Epidemiol.* 2016; 6, 32334. <https://doi.org/10.3402/iee.v6.32334>
14. Bateson, M., Feenders, G., 2010. The use of passerine bird species in laboratory research: Implications of basic biology for husbandry and welfare. *ILAR J.* 51, 394–408. <https://doi.org/10.1093/ilar.51.4.394>

15. Belaynehe K, Shin S, Yoo H. Interrelationship between tetracycline resistance determinants, phylogenetic group affiliation and carriage of class 1 integrons in commensal *Escherichia coli* isolates from cattle farms. *BMC Vet. Res.* 2018; 14, 340. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1661-3>
16. Ben Yahia H, Chairat S, Gharsa H, Alonso C, Ben Sallem R, Porres-Osante N, Hamdi N, Torres C, Ben Slama K. First Report of KPC-2 and KPC-3-Producing Enterobacteriaceae in Wild Birds in Africa. *Microb. Ecol.* 2020; 79, 30–37. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01375-x>
17. Ben Yahia H, Chairat S, Hamdi N, Gharsa H, Ben Sallem R, Ceballos S, Torres C, Ben Slama K. Antimicrobial resistance and genetic lineages of faecal enterococci of wild birds: Emergence of *vanA* and *vanB2* harbouring *Enterococcus faecalis*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2018. 52, 936–941. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.05.005>
18. Ben Yahia H, Ben Sallem R, Ben Tayh G, Klibi N, Amor I, Ben Gharsa H, Boudabbous A, Slama K. Detection of CTX-M-15 harboring *Escherichia coli* isolated from wild birds in Tunisia. *BMC microbiology.* 2018; 18.1, 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1163-2>

19. Binda E, Marinelli F, Marcone G. Old and new glycopeptide antibiotics: Action and resistance. *Antibiotics*. 2014; 3, 572–594. <https://doi.org/10.3390/antibiotics3040572>
20. Binsker U, Annemarie K, Hammerl J. Global colistin use: a review of the emergence of resistant Enterobacterales and the impact on their genetic basis. *FEMS Microbiol Rev*. 2022; 9;46(1). [https://doi: 10.1093/femsre/fuab049](https://doi.org/10.1093/femsre/fuab049)
21. Blanco G, Lemus J, Grande J. Microbial pollution in wildlife: Linking agricultural manuring and bacterial antibiotic resistance in red-billed choughs. *Environ. Res*. 2009;109, 405–412. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2009.01.007>
22. Blanco G, Lemus J, Grande J, Gangoso L, Grande J, Donázar J, Arroyo B, Frías O, Hiraldo F. Geographical variation in cloacal microflora and bacterial antibiotic resistance in a threatened avian scavenger in relation to diet and livestock farming practices. *Environ. Microbiol*. 2007; 9, 1738–1749. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01291.x>
23. Bonnedahl J, Drobni M, Gauthier-Clerc M, Hernandez J, Granholm S, Kayser Y, Melhus Å, Kahlmeter G, Waldenström J, Johansson A, Olsen B. Dissemination of *Escherichia coli* with CTX-M type ESBL between humans and yellow-legged gulls in the south of France. *PLoS One*. 2009;

- 4, 2–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005958>
24. Bonnedahl J, Järhult J. Antibiotic resistance in wild birds. *Ups. J. Med. Sci.* 2014; 119, 113–116. <https://doi.org/10.3109/03009734.2014.905663>
25. Bonnedahl J, Olsen B, Waldenström J, Broman T, Jalava J, Huovinen P, Österblad M. Antibiotic susceptibility of faecal bacteria in Antarctic penguins. *Polar Biol*; 2008; 31, 759–763. <https://doi.org/10.1007/s00300-008-0430-3>
26. Bouza E. Klebsiella and Enterobacter: Antibiotic resistance and treatment implications. *Semin. Respir. Infect.* 2002; 17, 215–230. <https://doi.org/10.1053/srin.2002.34693>
27. Laboratorios Britania. Discos de L.A.P. (Leucino Amino Peptidasa). Argentina. 2022. [WWW Document]. URL [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_618bdab8ea486.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_618bdab8ea486.pdf)
28. Laboratorios Britania. PYR-A-ENT. Argentina. 2020. [WWW Document]. URL [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_6151bb68ac1be.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6151bb68ac1be.pdf)

29. Bryan A, Shapir N, Sadowsky M. Frequency and Distribution of Tetracycline Resistance Genes in Genetically Diverse, Nonselected, and Nonclinical *Escherichia coli* Strains Isolated from Diverse Human and Animal Sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70, 2503–2507. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2503-2507.2004>
30. Butler M, Hansford K, Blaskovich M, Halai R, Cooper M. Glycopeptide antibiotics: Back to the future. *J. Antibiot.* 2014; 67, 631–644. <https://doi.org/10.1038/ja.2014.111>
31. Byappanahalli M, Nevers M, Korajkic A, Staley Z, Harwood V. Enterococci in the Environment. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2012; 76, 685–706. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00023-12>
32. Carrillo B, Chavez C., Trueba, G., 2022. Surprising Absence of Antibiotic Resistance in *Salmonella enterica* Isolates from Galapagos Marine Iguanas (*Amblyrhynchus cristatus*), in: Thompson, A.L., Ochoa-Herrera, V., Teran, E. (Eds.), *Water, Food and Human Health in the Galapagos, Ecuador: ‘‘A Little World Within Itself’’*. Springer International Publishing, Cham, pp. 181–186. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-92411-9\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-030-92411-9_11)
33. Carrillo B, Chavez C, Trueba G. Surprising Absence of Antibiotic Resistance in *Salmonella enterica* Isolates from Galapagos Marine Iguanas (*Amblyrhynchus cristatus*). En: Thompson A, Ochoa V, Teran E. *Water,*

Food and Human Health in the Galapagos, Ecuador:" A Little World Within Itself." Springer International Publishing, 2022, p.181.

34. Carvalho I, Tejedor M, González M, Corbera J, Suárez A, Silva V, Igrejas G, Torres C, Poeta P. Molecular diversity of Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* from vultures in Canary Islands. *Environ. Microbiol. Rep.* 2020. 12, 540–547. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12873>
35. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Glossary of Terms Related to Antibiotic Resistance. EEUU, 2019. [WWW Document] URL [https://www.cdc.gov/narms/resources/glossary.html#:~:text=Multidrug-resistant \(MDR\) isolate,to one or more antibiotics.](https://www.cdc.gov/narms/resources/glossary.html#:~:text=Multidrug-resistant%20(MDR)%20isolate,to%20one%20or%20more%20antibiotics.)
36. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7 , *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes , *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. PulseNet, 2017; 157, 1–16. [WWW Document]. URL <https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>
37. Chamosa L, Álvarez V, Nardelli M, Quiroga M, Cassini M, Centrón D. Lateral Antimicrobial Resistance Genetic Transfer is active in the open environment. *Sci. Rep.* 2017; 7, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017->

00600-2

38. Cheong C, Hajeb P, Jinap S, Ismail M. Sulfonamides determination in chicken meat products from Malaysia. *Int. Food Res J.* 2010; 17 (4), 885–892.
39. Cho H, Lee W. Interspecific comparison of the fecal microbiota structure in three Arctic migratory bird species. *Ecol. Evol.* 2020; 10, 5582–5594. <https://doi.org/10.1002/ece3.6299>
40. Chopra I, Roberts M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2001a; 65, 232–260. <https://doi.org/10.1128/mnbr.65.2.232-260.2001>
41. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards For Antimicrobial Susceptibility Testing*. Edition, 29th ed. CLSI, 2019.
42. Cochetti I, Vecchi M, Mingoia M, Tili E, Catania M, Manzin A, Varaldo P, Montanari M. Molecular characterization of pneumococci with efflux-mediated erythromycin resistance and identification of a novel *mef* gene subclass, *mef(I)*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49, 4999–5006. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.12.4999-5006.2005>

43. Crofts T, Gasparrini A, Dantas G. Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. *Nat. Rev. Microbiol.* 2017; 15, 422–434. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.28>
44. Dcosta V, King C, Kalan L, Morar M, Sung W, Schwarz C, Froese D, Zazula G, Calmels F, Debruyne R, Golding G, Poinar H, Wright G. Antibiotic resistance is ancient. *Nature.* 2011; 477, 457–461. <https://doi.org/10.1038/nature10388>
45. Dierikx C, van Essen-Zandbergen A, Veldman K, Smith H, Mevius D. Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. *Vet. Microbiol.* 2010; 145, 273–278. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.03.019>
46. Sigirci B, Celik B, Kahraman B, Bagcigil A, Ak S. Tetracycline Resistance of Enterobacteriaceae Isolated From Feces of Synanthropic Birds. *J. Exot. Pet Med.* 2019; 28, 13–18. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2017.12.003>
47. Dolejska M, Literak I. Wildlife is overlooked in the epidemiology of medically important antibiotic-resistant bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2019; 28, 13-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01167-19>
48. Durso L, Miller D, Wienhold, B. Distribution and Quantification of Antibiotic Resistant Genes and Bacteria across Agricultural and Non-

- Agricultural Metagenomes. *PLoS One*. 2012; 7, 1–12.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048325>
49. Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33, 24–27.
50. European Medicines Agency (EMA). Answers to the request for scientific advice on the impact on public health and animal health of the use of antibiotics in animals. 2014.
51. Ettema T, Andersson S. The  $\alpha$ -proteobacteria: The Darwin finches of the bacterial world. *Biol. Lett.* 2009; 5, 429–432.  
<https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0793>
52. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*. 2009; 155, 1749–1757.  
<https://doi.org/10.1099/mic.0.026385-0>
53. Foti M, Mascetti A, Fisichella V, Fulco E, Orlandella B, Lo Piccolo F. Antibiotic resistance assessment in bacteria isolated in migratory Passeriformes transiting through the Metaponto territory (Basilicata, Italy). *Avian Res.* 2017; 8, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40657-017-0085-2>

54. Franco A, Hendriksen R, Lorenzetti S, Onorati R, Gentile G, Dell’Omo G, Aarestrup F, Battisti A. Characterization of salmonella occurring at high prevalence in a population of the land iguana *conolophus subcristatus* in Galápagos Islands, Ecuador. *PLoS One*. 2011; 6, 1–5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023147>
55. Frazzon A, Gama B, Hermes V, Bierhals C, Pereira R, Guedes A, d’Azevedo P, Frazzon J. Prevalence of antimicrobial resistance and molecular characterization of tetracycline resistance mediated by tet(M) and tet(L) genes in *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2010; 26, 365–370. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0160-x>
56. Furuya E, Lowy F. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat. Rev. Microbiol.* 2006; 4, 36–45. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1325>
57. Gambino D, Vicari D, Vitale M, Schirò G, Mira F, La Giglia M, Riccardi A, Gentile A, Giardina S, Carrozzo A, Cumbo V, Lastra A, Gargano V. Study on bacteria isolates and antimicrobial resistance in wildlife in Sicily, southern Italy. *Microorganisms.* 2021; 9, 1–14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010203>
58. García-Solache M, Rice L. The enterococcus: A model of adaptability to its environment. *Clin. Microbiol. Rev.* 2019; 32.

<https://doi.org/10.1128/CMR.00058-18>

59. García L, Torres C, López A, Rodríguez C, Valencia C. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from wild mammals in Aragón, Spain . *J. Vet. Res.* 2022. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2022-0020>
60. Gavrilets S, Losos J. Adaptive Radiation: Contrasting Theory with Data. *Science.* 2009; (80) 323, 732–737. <https://doi.org/10.1126/science.1157966>
61. Giacobello C, Foti M, Mascetti A, Grosso F, Ricciardi D, Fisichella V, Piccolo F. Antimicrobial resistance patterns of Enterobacteriaceae in European wild bird species admitted in a wildlife rescue centre. *Vet. Ital.* 2016; 52, 139–144. <https://doi.org/10.12834/VetIt.327.1374.2>
62. Gibbs P, Newbrey J, Petermann S, Wooley R, Vinson H, Reed W. Identification, antimicrobial resistance profiles, and virulence of members from the family Enterobacteriaceae from the feces of yellow-headed blackbirds (*Xanthocephalus xanthocephalus*) in North Dakota. *Avian Dis.* 2007; 51, 649–655. [https://doi.org/10.1637/0005-2086\(2007\)51\[649:IARPAV\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1637/0005-2086(2007)51[649:IARPAV]2.0.CO;2)
63. Gorla N. Los animales domésticos y silvestres como centinelas de salud ambiental Domestic and wild animals as sentinels of environmental health. *Rev. electrónica difusión científica / Univ. Juan Agustín Maz.* 2016; 1, 1–7.

64. Grant P, Grant R. Years of Evolution: Darwin's Finches on Daphne Major Island. En: The Auk, Ornithological Advances. Vol 131, No.4. Oxford University Press, 2014, p. 779-781.
65. Grant P, Grant B. How and Why Species Multiply: The Radiation of Darwin's Finches., The Quarterly Review of Biology. Princeton University Press, New Jersey. 2008; <https://doi.org/10.1086/592628>
66. Grossman T. Tetracycline antibiotics and resistance. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2016; 6, 1–24. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025387>
67. Guenther S, Ewers C, Wieler L. Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution? Front. Microbiol. 2011; 2, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00246>
68. Guenther S, Grobbel M, Lübke-Becker A, Goedecke A, Friedrich N, Wieler L, Ewers C. Antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* from common European wild bird species. Vet. Microbiol. 2010; 144, 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.12.016>
69. Johnson A, Uttley A, Woodford N, George R. Resistance to vancomycin and teicoplanin: an emerging clinical problem. Clin Microbiol Rev. 1990 Jul;3(3):280-91. doi: 10.1128/CMR.3.3.280.

PMID.

70. Handrova L, Kmet V. Antibiotic resistance and virulence factors of *Escherichia coli* from eagles and goshawks. *J. Environ. Sci. Heal. - Part B.* 2019; 54, 605–614. <https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1608103>
71. Hasan B, Laurell K, Rakib M, Ahlstedt E, Hernandez J, Caceres M, Järhult J. Fecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in healthy humans, poultry, and wild birds in León, Nicaragua—a shared pool of *bla*<sub>CTX-M</sub> genes and possible interspecies clonal spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases-producing *Escherichia coli*. *Microb. Drug Resist.* 2016; 22, 682–687. <https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0323>
72. Hasman H, Mevius D, Veldman K, Olesen I, Aarestrup F.  $\beta$ -Lactamases among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005; 56, 115–121. <https://doi.org/10.1093/jac/dki190>
73. Hathcock T, Poudel A, Kang Y, Butaye P, Raiford D, Mobley T, Wang C, Bellah J. Multidrug-resistant *Escherichia coli* and tetracycline-resistant *enterococcus faecalis* in wild raptors of Alabama and Georgia, USA. *J. Wildl. Dis.* 2019. 55; 482–487. <https://doi.org/10.7589/2018-05-139>

74. Hau M, y Wikelski M. Darwin's Finches. *Life Sci.* 2001; 1–8.  
<https://doi.org/10.1038/npg.els.0001791>
75. Hilty M, Sendi P, Seiffert S, Droz S, Perreten V, Hujer A, Bonomo R, Mühlemann K, Endimiani A. Characterisation and clinical features of *Enterobacter cloacae* bloodstream infections occurring at a tertiary care university hospital in Switzerland: Is cefepime adequate therapy? *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2013; 41, 236–249.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.10.022>
76. Ho P, Liu M, Lo W, Lai E, Lau T, Law O, Chow K. Prevalence and characterization of hybrid blaCTX-M among *Escherichia coli* isolates from livestock and other animals. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2015; 82, 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.02.010>
77. Holmes A, Moore L, Sundsfjord A, Steinbakk M, Regmi S, Karkey A, Guerin P, Piddock L. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet*; 2016. 387, 176–187.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00473-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00473-0)
78. Horn R, Cardoso W, Lopes E, Teixeira R, Albuquerque Á, Rocha-e-Silva, R, Machado D, Bezerra W. Identification and antimicrobial resistance of members from the Enterobacteriaceae family isolated from canaries (*Serinus Canaria*). *Pesqui. Vet. Bras.* 2015; 35, 552–556.

<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015000600011>

79. Hudzicki J. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. *Am. Soc. Microbiol.* 2009; 1–14.
80. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC). Galápagos tiene 25.244 habitantes según el censo 2015. [WWW Document]. Inst. Nac. Estadísticas y Censos. URL <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/galapagos-tiene-25-244-habitantes-segun-censo-2015/>
81. Islam M, Sobur M, Rahman S, Ballah F, Ievy S, Siddique M, Rahman M, Kafi M, Rahman M. Detection of blaTEM, blaCTX-M, blaCMY, and blaSHV Genes Among Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Migratory Birds Travelling to Bangladesh. *Microb. Ecol.* 2021; 83,4 942–950. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01803-x>
82. Jacoby G. AmpC B-Lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 2009; 22, 161–182. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08>
83. Janda J, Abbott S. The Changing Face of the Family Enterobacteriaceae (Order: “Enterobacterales”): new members, taxonomic issues, geographic expansion, and new diseases and disease syndromes. *Clin Microbiol Rev.* 2021; 34,2. 174-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00174-20>

84. Kim D, Cha C. Antibiotic resistome from the One-Health perspective: understanding and controlling antimicrobial resistance transmission. *Exp. Mol. Med.* 2021; 53, 301–309. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00569-z>
85. King D, Sobhanifar S, Strynadka N. The Mechanisms of Resistance to  $\beta$ -Lactam Antibiotics. En: *Handbook of Antimicrobial Resistance*. Springer New York, 2017, p. 177–201. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0694-9\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0694-9_10)
86. Klibi N, Ben Amor I, Rahmouni M, Dziri R, Douja G, Ben Said L, Lozano C, Boudabous A, Ben Slama K, Mansouri R, Torres C. Diversity of species and antibiotic resistance among fecal enterococci from wild birds in Tunisia. Detection of vanA-containing *Enterococcus faecium* isolates. *Eur. J. Wildl. Res.* 2015; 61, 319–323. <https://doi.org/10.1007/s10344-014-0884-2>
87. Knutie S, Chaves J, Gotanda K. Human activity can influence the gut microbiota of Darwin's finches in the Galapagos Islands. *Mol. Ecol.* 2019; 28, 2441–2450. <https://doi.org/10.1111/mec.15088>
88. Kristich C, Rice L, Arias C. Enterococcal Infection — Treatment and Antibiotic Resistance Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. En: Gilmore M, Clewell D, Ike, *Enterococci*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014, p. 1–31.

89. Kutkowska J, Turska-Szewczuk A, Kucharczyk M, Kucharczyk H, Zalewska J, Urbanik-Sypniewska T. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and glycopeptide-resistant enterococci in fecal samples of birds from South-Eastern Poland. *BMC Vet. Res.* 2019; 15, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2221-1>
90. Levine P. Vancomycin : A History. *Clinical infectious diseases.* 2006. 42, 5–12. <https://doi.org/10.1086/491709>
91. Li B, Sun J, Liu Q, Han L, Huang X, Ni Y. High prevalence of CTX-M  $\beta$ -lactamases in faecal *Escherichia coli* strains from healthy humans in Fuzhou, China. *Scand. J. Infect. Dis.* 2011; 43, 170–174. <https://doi.org/10.3109/00365548.2010.538856>
92. Lima L, Silva B, Barbosa G, Barreiro E.  $\beta$ -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *Eur. J. Med. Chem.* 2020; 208, 112829. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112829>
93. Liu Y, Wang Y, Walsh T, Yi L, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu L, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu J, Shen J. 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.* 2015; 161-168 [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)

94. Loayza F, Salinas L, Tijet N, Villavicencio F, Tamayo R, Salas S, Rivera R, Villacis J, Satan C, Ushiña L, Muñoz O, Zurita J, Melano R, Reyes J, Trueba G. Diverse *Escherichia coli* lineages from domestic animals carrying colistin resistance gene *mcr-1* in an Ecuadorian household. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2020; 22, 63–67. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.12.002>
95. Lopardo H. *Introducción a la microbiología clínic.* Horacio Lo. ed. Universidad Nacional de La Plata. 2016.
96. Maksimović Z, Maksimović A, Lutvikadić I, Rifatbegović M. Methicillin-resistant staphylococcus aureus isolated from nonhealing wound in a canary bird (*Serinus canaria domestica*). *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.* 2021; 68, 407–409. <https://doi.org/10.33988/auvfd.837567>
97. Markley J, Wencewicz T. Tetracycline-inactivating enzymes. *Front. Microbiol.* 2018; 9, 1–22. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01058>
98. Marosevic D, Kaevska M, Jaglic Z. Resistance to the tetracyclines and macrolide-lincosamide-streptogramin group of antibiotics and its genetic linkage – A review. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2017; 24, 338–344. <https://doi.org/10.26444/aaem/74718>
99. Marrow J, Whittington J, Mitchell M, Hoyer L, Maddox C. Prevalence and

- antibiotic-resistance characteristics of *Enterococcus* spp. isolated from free-living and captive raptors in central illinois. *J. Wildl. Dis.* 2009; 45, 302–313. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-45.2.302>
100. Martinez J. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 2009; 276, 2521–2530. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0320>
101. Martiny H, Munk P, Brinch C, Szarvas J, Aarestrup F, Petersen T. Global Distribution of *mcr* Gene Variants in 214K Metagenomic Samples. *mSystems* 7. 2022; 2. <https://doi.org/10.1128/msystems.00105-22>
102. Merkevičienė L, Klimienė I, Siugzdiniene R, Virgailis M, Mockeliunas R, Ruzauskas M. Prevalence and molecular characteristics of multi-resistant *Escherichia coli* in wild birds. *Acta Vet. Brno.* 2018; 87, 9–17. <https://doi.org/10.2754/avb201887010009>
103. Mezzatesta M, Gona F, Stefani S. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiol.* 2012. 7, 887–902. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.61>
104. Michalova E, Novotna P, Schlegelova J. Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them. *Vet. Med. (Praha).* 2004; 49, 79–100. <https://doi.org/10.17221/5681-VETMED>

105. Michel A, Ward L, Goffredi S, Dawson K, Baldassarre D, Brenner A, Gotanda K, McCormack J, Mullin S, O'Neill A, Tender G, Uy J, Yu K, Orphan V, Chaves J. The gut of the finch: uniqueness of the gut microbiome of the Galápagos vampire finch. *Microbiome*. 2018; 6, 167. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0555-8>
106. Millar B, Jiru X, Moore J, Earle J. A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. *J. Microbiol. Methods*. 2000; 42, 139–147. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00174-3](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00174-3)
107. Miller E, Ponder J, Willette M, Johnson T, VanderWaal K. Merging Metagenomics and Spatial Epidemiology To Understand the Distribution of Antimicrobial Resistance Genes from Enterobacteriaceae in Wild Owls. *Appl. Environ. Microbiol.* 2020; 86. <https://doi.org/10.1128/AEM.00571-20>
108. Miller W, Munita J, Arias C. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2014; 12, 1221–1236. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.956092>
109. Mukerji S, Gunasekera S, Dunlop J, Stegger M, Jordan D, Laird T, Abraham R, Barton M, O'Dea M, Abraham S. Implications of Foraging and Interspecies Interactions of Birds for Carriage of Escherichia coli Strains

- Resistant to Critically Important Antimicrobials. *Appl. Environ. Microbiol.* 2020; 86. <https://doi.org/10.1128/AEM.01610-20>
110. Muñoz A. La contradicción del turismo en la conservación y el desarrollo en Galápagos - Ecuador. *Estud. y Perspect. en Tur.* 2015. 24, 399–413.
111. Nieto A, Deem S, Rodríguez C, Cano S, Moity N, Cabrera F, Esperón F. Antimicrobial resistance in Galapagos tortoises as an indicator of the growing human footprint. *Environ. Pollut.* 2021; 284. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117453>
112. Nieto A, Esperón F, Blake S, Deem S. Antimicrobial resistance genes present in the faecal microbiota of free-living Galapagos tortoises (*Chelonoidis porteri*). *Zoonoses Public Health.* 2019; 66, 900–908. <https://doi.org/10.1111/zph.12639>
113. Nowaczek A, Dec M, Sępień D, Urban R, Marek A, Różański P. Antibiotic resistance and virulence profiles of escherichia coli strains isolated from wild birds in poland. *Pathogens.* 2021;10, 1–14. <https://doi.org/10.3390/pathogens10081059>
114. O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. 2016; <https://doi.org/https://doi.org/APO-63983>

115. Organización Mundial de la Salud (OMS). Lista OMS de Antimicrobianos de Importancia Crítica para la Medicina Humana. 2019.
116. Organización Mundial de la Salud (OMS), Lista OMS de Antimicrobianos de Importancia Crítica para la Medicina Humana. Crit. important Antimicrob. Hum. Med. 5th Revis. 2018; 5, 41.
117. Oravcova V, Hadelova D, Literak I. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with *vanA* gene isolated for the first time from wildlife in Slovakia. Vet. Microbiol. 2016; 194, 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.11.027>
118. Ortega D, Barba P, Zurita J. Short report colistin-resistant *Escherichia coli* clinical isolate harbouring the *mcr-1* gene in Ecuador. Epidemiol. Infect. 2016; 144, 2967–2970. <https://doi.org/10.1017/S0950268816001369>
119. Oteo J, Menciá A, Bautista V, Pastor N, Lara N, González F, García F, Campos J. Colonization with enterobacteriaceae-producing ESBLs, AmpCs, and OXA-48 in wild avian species, Spain 2015-2016. Microb. Drug Resist. 2018; 24, 932–938. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0004>
120. Overbey K, Hatcher S, Stewart J. Water quality and antibiotic resistance at beaches of the Galápagos Islands. Front. Environ. Sci. 2015; 3. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2015.00064>

121. Pantozzi F. Evaluación fenotípica y genotípica de la resistencia a tetraciclina en cepas de *Escherichia coli* de origen animal. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. 2018.
122. Partridge S, Kwong S, Firth N, Jensen S. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 2018; 31. <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
123. Paterson D. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am. J. Infect. Control.* 2006; 34, 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.05.238>
124. Périchon B, Courvalin P. Glycopeptide Resistance. En: *Antibiotic Discovery and Development*. Springer US, Boston, MA. 2012; pp. 515–542. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1400-1\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1400-1_15)
125. Pinto L, Radhouani H, Coelho C, Martins da Costa P, Simões R, Brandão R, Torres C, Igrejas G, Poeta P. Genetic Detection of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Containing *Escherichia coli* Isolates from Birds of Prey from Serra da Estrela Natural Reserve in Portugal. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010; 76, 4118–4120. <https://doi.org/10.1128/AEM.02761-09>
126. Parque Nacional Galápagos (PNG). Parque Nacional Galápagos. Ecuador, 2022. [WWW Document]. URL <https://galapagos.gob.ec/parque-nacional->

galapagos/

127. Poirel L, Potron A, De La Cuesta C, Cleary T, Nordmann P, Munoz L. Wild coastline birds as reservoirs of broad-spectrum- $\beta$ -lactamase- producing Enterobacteriaceae in Miami Beach, Florida. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56, 2756–2758. <https://doi.org/10.1128/AAC.05982-11>
128. Quinn P, Markey B, Leonard F, FitzPatrick E, Fanning S. *Concise Review of Veterinary Microbiology*. Jhon Wiley and Sons. 16th ed, 2016.
129. Quinn P, Markey B, Leonard F, Hartigan P, Fanning, S, Fitzpatrick E. *Veterinary Microbiology and Microbial Diseases*. Jhon Wiley and Sons. Second ed, 2011.
130. Radhouani H, Poeta P, Gonçalves A, Pacheco R, Sargo R, Igrejas G. Wild birds as biological indicators of environmental pollution: antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* and enterococci isolated from common buzzards (*Buteo buteo*). *J. Med. Microbiol.* 2012; 61, 837–843. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.038364-0>
131. Radimersky T, Frolkova P, Janoszowska D, Dolejska M, Svec P, Roubalova E, Cikova P, Cizek A, Literak I. Antibiotic resistance in faecal bacteria (*Escherichia coli*, *Enterococcus* spp.) in feral pigeons. *J. Appl. Microbiol.* 2010; 5, 1687–95. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04797.x>

132. Ralph C, Dunn E, Peach W, Handel C. Recommendations for the Use of Mist Nets for Inventory and Monitoring of Bird Populations. *Stud. Avian Biol.* 2001; 29, 187–196.
133. Ramey A, Ahlstrom C. Antibiotic resistant bacteria in wildlife: Perspectives on trends, acquisition and dissemination, data gaps, and future directions. *J. Wildl. Dis.* 2020; 56, 1–15. <https://doi.org/10.7589/2019-04-099>
134. Rebelo A, Bortolaia V, Kjeldgaard J, Pedersen S, Leekitcharoenphon P, Hansen I, Guerra B, Malorny B, Borowiak M, Hammerl J, Battisti A, Franco A, Alba P, Perrin-Guyomard A, Granier S, de Frutos C, Escobar M, Villa L, Carattoli A, Hendriksen R. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Eurosurveillance.* 2018; 23, 1–11. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672>
135. Roberts M. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005; 245, 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.02.034>
136. Roberts M, No D, Marzluff J, Delap J, Turner R. Vancomycin resistant *Enterococcus* spp. from crows and their environment in metropolitan Washington State, USA: Is there a correlation between VRE positive crows

- and the environment? *Vet. Microbiol.* 2016; 194, 48–54.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.01.022>
137. Roberts M, Schwarz S. Tetracycline and Chloramphenicol Resistance Mechanisms. *Antimicrob. Drug Resist.* 2009; 183–193.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-59745-180-2\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-180-2_15)
138. Rose J, Gast R, Bogomolni A, Ellis J, Lentell B, Touhey K, Moore M. Occurrence and patterns of antibiotic resistance in vertebrates off the Northeastern United States coast. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2009; 67, 421–431.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00648.x>
139. Rossolini G, Arena F, Giani T. Mechanisms of Antibacterial Resistance, Fourth Edi. ed, *Infectious Diseases.* Elsevier Ltd, 2017.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-7020-6285-8.00138-6>
140. Ruppé É, Woerther P, Barbier F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Ann. Intensive Care.* 2015;5.  
<https://doi.org/10.1186/s13613-015-0061-0>
141. Ruzauskas M, Vaskeviciute L. Detection of the *mcr-1* gene in *Escherichia coli* prevalent in the migratory bird species *Larus argentatus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2016; 71, 2333–2334. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw245>

142. Santos T, Silva N, Igrejas G, Rodrigues P, Micael J, Rodrigues T, Resendes R, Gonçalves A, Marinho C, Gonçalves D, Cunha R, Poeta P. Dissemination of antibiotic resistant *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* from wild birds of Azores Archipelago. *Anaerobe*. 2013; 24, 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.09.004>
143. Sato A, O’huigin C, Figueroa F, Grant P, Grant B, Tichy H, Klein J. Phylogeny of Darwin’s finches as revealed by mtDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999; 96, 5101–5106. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.9.5101>
144. Schell C. Caracterización fenotípica y genotípica de cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de líquidos obtenidos por punción provenientes de infecciones invasivas humanas. Tesis Doctoral. Estudios Microbiológicos y parasitológicos. Universidad Nacional de La Plata, 2018.
145. Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol. Rev.* 2004; 28, 519–542. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.04.001>
146. Siefert J. Defining the Mobilome. *Horizontal gene transfer*. 2009; p. 13–27. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-853-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-853-9_2)
147. Silva N, Igrejas G, Rodrigues P, Rodrigues T, Gonçalves A, Felgar A,

- Pacheco R, Gonçalves D, Cunha R, Poeta P. Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-containing *Escherichia coli* isolates in wild birds from the Azores Archipelago. *Avian Pathol.* 2011; 40, 473–479. <https://doi.org/10.1080/03079457.2011.599061>
148. Silva V, Nicoli J, Nascimento T, Diniz C. Diarrheagenic *Escherichia coli* strains recovered from urban pigeons (*Columba livia*) in Brazil and their antimicrobial susceptibility patterns. *Curr. Microbiol.* 2009; 59, 302–308. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9434-7>
149. Skarżyńska M, Zając M, Bomba A, Bocian Ł, Kozdruń W, Polak M, Wiącek J, Wasyl D. Antimicrobial Resistance Glides in the Sky—Free-Living Birds as a Reservoir of Resistant *Escherichia coli* With Zoonotic Potential. *Front. Microbiol.* 2021; 12, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.656223>
150. Skinner M, Gurerrero C, Muksitul Haque M, Nilsson E, Koop J, Knutie S, Clayton D. Epigenetics and the evolution of Darwin's finches. *Genome Biol. Evol.* 6. 2014; 1972–1989. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu158>
151. Smet A, Martel A, Persoons D, Dewulf J, Heyndrickx M, Herman L, Haesebrouck F, Butaye P. Broad-spectrum  $\beta$ -lactamases among *Enterobacteriaceae* of animal origin: Molecular aspects, mobility and impact on public health. *FEMS Microbiol. Rev.* 2010; 34, 295–316.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00198.x>

152. Smith H, Mccracken J, Shepherd D, Velez P. The Mist Netter's Bird Safety Handbook. The Institute for Bird Populations. Pt Reyes Satation, Californis,1999.
153. Stępień D, Hauschild, Dec M, Marek A, Urban R. Clonal structure and antibiotic resistance of enterococcus spp. from wild birds in Poland. *Microb. Drug Resist.* 2019; 25, 1227–1237. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0461>
154. Stogios P, Savchenko A. Molecular mechanisms of vancomycin resistance. *Protein Sci.* 2020; 29, 654–669. <https://doi.org/10.1002/pro.3819>
155. Thaker M, Spanogiannopoulos P, Wright G. The tetracycline resistome. *Cell. Mol. Life Sci.* 2010; 67, 419–431. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0172-6>
156. Thakur S, Gray G. The mandate for a global “one health” approach to antimicrobial resistance surveillance. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2019; 100, 227–228. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0973>
157. Thaller M, Migliore L, Marquez C, Tapia W, Cedeño V, Rossolini G, Gentile G. Tracking acquired antibiotic resistance in commensal bacteria of galápagos land iguanas: No man, no resistance. *PLoS One.* 2010; 5, 3–6.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008989>

158. Thomas C. Paradigms of plasmid organization. *Mol. Microbiol.* 2000; 37, 485–491. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02006.x>
159. Tooke C, Hinchliffe P, Bragginton E, Colenso C, Hirvonen V, Takebayashi Y, Spencer J.  $\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J. Mol. Biol.* 2019; 431, 3472–3500. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>
160. Torres C. La Resistencia Bacteriana a los Antibióticos, Siete Décadas después de Fleming. La Academia, Zaragoza, 2012.
161. Toussaint K, Gallagher J.  $\beta$ -Lactam/ $\beta$ -Lactamase Inhibitor Combinations. *Ann. Pharmacother.* 2015; 49, 86–98. <https://doi.org/10.1177/1060028014556652>
162. Troncoso C, Pavez M, Santos A, Salazar R, Barrientos L. Implicancias Estructurales y Fisiológicas de la Célula Bacteriana en los Mecanismos de Resistencia Antibiótica. *Int. J. Morphol.* 2017; 35, 1214–1223. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022017000401214>
163. Tye A, Snell H, Peck S, Adersen H. Outstanding terrestrial features of the Galapagos archipelago. *A Biodivers. Vis. Galapagos Islands.* 2002; 12–23.

164. Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) Galápagos Islands. Ecuador, 2022. [WWW Document]. URL <https://whc.unesco.org/en/list/1/>
165. Veldman K, van Tulden P, Kant A, Testerink J, Mevius D. Characteristics of Cefotaxime-Resistant *Escherichia coli* from Wild Birds in The Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 79, 7556–7561. <https://doi.org/10.1128/AEM.01880-13>
166. Velkov T, Thompson P. Structure– activity relationships of polymyxin antibiotics." *Journal of medicinal chemistry.* 2010; 53.5 (2010): 1898-1916. <https://doi.org/10.1021/jm900999h>.Structure
167. Vittecoq M, Godreuil S, Prugnotte F, Durand P, Brazier L, Renaud N, Arnal A, Aberkane S, Jean-Pierre H, Gauthier-Clerc M, Thomas F, Renaud F. REVIEW: Antimicrobial resistance in wildlife. *J. Appl. Ecol.* 2016; 53, 519–529. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12596>
168. Vuthy Y, Lay K, Seiha H, Kerleguer A, Aidara-Kane A. Antibiotic susceptibility and molecular characterization of resistance genes among *Escherichia coli* and among *Salmonella* subsp. in chicken food chains. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2017; 7, 670–674. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.07.002>

169. Waite D, Taylor M. Exploring the avian gut microbiota: Current trends and future directions. *Front. Microbiol.* 2015. 6, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00673>
170. Wall B, Mateus A, Marshall L, Pfeiffer D, Lubroth J, Ormel H, Patriarchi A. Drivers, dynamics and epidemiology of antimicrobial resistance in animal production. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016.
171. Walsh S, McCleary A, Heumann B, Brewington L. Community Expansion and Infrastructure Development: Implications for Human Health and Environmental Quality in the Galápagos Islands of Ecuador. *J. Lat. Am. Geogr.* 2010; 9, 137–159. <https://doi.org/10.1353/lag.2010.0024>
172. Wang C, Feng Y, Liu L, Wei L, Kang M, Zong Z. Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. *Emerg. Microbes Infect.* 2020; 9, 508–516. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1732231>
173. Wang J, Ma Z, Zeng Z, Yang X, Huang Y, Liu J. The role of wildlife (wild birds) in the global transmission of antimicrobial resistance genes. *Zool. Res.* 2017; 38, 55–80. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2017.003>
174. Watson J, Trueman M, Tufet M, Henderson S, Atkinson R. Mapping terrestrial anthropogenic degradation on the inhabited islands of the

- Galapagos Archipelago. *Oryx*. 2010; 44, 79–82.  
<https://doi.org/10.1017/S0030605309990226>
175. Wheeler E, Hong P, Bedon L, Mackie R. Carriage of antibiotic-resistant enteric bacteria varies among sites in Galapagos reptiles. *J. Wildl. Dis.* 2012; 48, 56–67. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-48.1.56>
176. White A, Hughes J. Critical Importance of a One Health Approach to Antimicrobial Resistance. *Ecohealth*. 2019; 16, 404–409.  
<https://doi.org/10.1007/s10393-019-01415-5>
177. World Health Organization (WHO). Critically Important Antimicrobials for Human Medicine : Critically important antimicrobials for Human medicine: Agenda 29–31, 2007.
178. World Health Organization (WHO). Antimicrobial Resistance, World Health Organization, 2014. [WWW Document]. URL  
<https://doi.org/10.1016/j.giec.2020.06.004>
179. World Health Organization WHO Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance in Foodborne Bacteria Application of a One Health Approach (WHO/AGISAR). 2017.
180. Wright G. Antibiotic resistance: Where does it come from and what can we

do about it? *BMC Biol.* 2010; 8. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-123>

181. Wright G. The antibiotic resistome: The nexus of chemical and genetic diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 2007; 5, 175–186. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1614>
182. Yamamoto Y, Calvopina M, Izurieta R, Villacres I, Kawahara R, Sasaki M, Yamamoto M. Colistin-resistant *Escherichia coli* with *mcr* genes in the livestock of rural small-scale farms in Ecuador. *BMC Res. Notes.* 2019; 12, 14–19. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4144-0>
183. Zaheer R, Cook S, Barbieri R, Goji N, Cameron A, Petkau A, Polo R, Tymensen L, Stamm C, Song J, Hannon S, Jones T, Church D, Booker C, Amoako, K, Van Domselaar G, Read R, McAllister T. Surveillance of *Enterococcus* spp. reveals distinct species and antimicrobial resistance diversity across a One-Health continuum. *Sci. Rep.* 2020; 10, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61002-5>
184. Zeballos D, Rojas Z, Salgado M, Poeta P, Torres C, Benavides J. The Role of Gulls as Reservoirs of Antibiotic Resistance in Aquatic Environments: A Scoping Review. *Front. Microbiol.* 2021; 12, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.703886>
185. Zeng D, Debabov D, Hartsell T, Cano R, Adams S, Schuyler J, McMillan R,

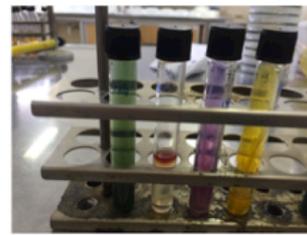
Pace J. Approved glycopeptide antibacterial drugs: Mechanism of action and resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016; 6, 1–16. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026989>

186. Zhang M, Shen Z, Rollins D, Fales W, Zhang S. Pilot Study of Antimicrobial Resistance in Northern Bobwhites (*Colinus virginianus*). *Avian Dis.* 2017; 61, 391–396. <https://doi.org/10.1637/11629-031517-RegR>

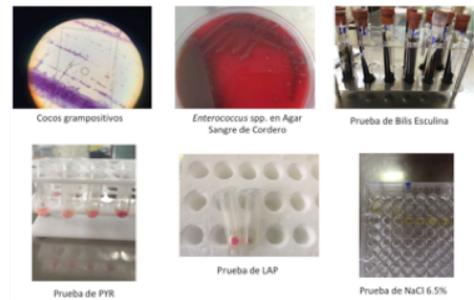
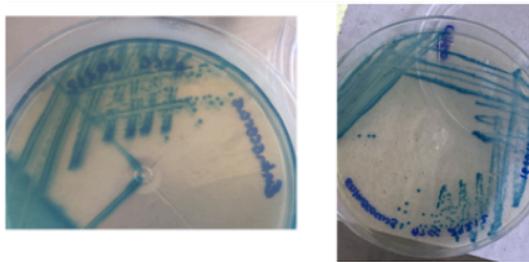
## 8. ANEXOS

### 8.1. ANEXO 1

#### 8.1.1. Aislamiento e Identificación Bioquímica de *Escherichia coli*



#### 8.1.2. Aislamiento e Identificación Bioquímica de *Enterococcus* spp.



## 8.2. ANEXO 2

### 8.2.1. Secuencia de primers, reacción de PCR y condiciones de termociclado del gen de resistencia a antimicrobianos en cepas aisladas de *Escherichia coli*

#### 8.2.1.1. Secuencia de primers, reacción de PCR y condiciones de termociclado de genes de Betalactamasas (*bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CMY</sub>) (Dierikx y col., 2010; Hasman y col., 2005)

##### Secuencias de primers CTX-M General

Gen	Primer	Secuencia	Tamaño
<i>bla</i> <sub>CTX-M-General</sub>	CTX-MU1	5'-ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC-3'	593 pb
<i>bla</i> <sub>CTX-M-General</sub>	CTX-MU2	5'-TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYCAGCGG-3'	

##### Reactivos Master Mix

Reactivo	Concentración final
Agua	.....
Templado	1 µl
Buffer	1 X
dNTP Mix	0,2 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
CTXMU1	1 pmol/µl
CTXMU2	1 pmol/µl
Taq	0,025 U/µl

##### Parámetros de ciclado

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	5 minutos	1
94°C	1 minuto	X 30
62 °C	30 segundos	
72 °C	1 minuto	
72 °C	7 minutos	1
10 °C	∞	

##### Secuencias de primers TEM

Gen	Primer	Secuencia	Tamaño
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	TEM-Fa	5'-GCG GAA CCC CTA TTT G-3'	964 pb
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	TEM-Ra	5'-ACC AAT GCT TAA TCA GTG AG-3'	

**Reactivos Master Mix**

Reactivo	Concentración final
Agua	.....
Templado	2 $\mu$ l
Buffer	1 X
dNTP Mix	0,2 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
TEM-Fa	1 pmol/ $\mu$ l
TEM-Ra	1 pmol/ $\mu$ l
Taq	0,025 U/ $\mu$ l

**Parámetros de ciclado**

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	4 minutos	1
94°C	1 minuto	
54 °C	1 minuto	X 35
72 °C	10 segundos	
72 °C	7 minutos	1
10 °C	$\infty$	

**Secuencias de primers SHV**

Gen	Primer	Secuencia	Tamaño
bla SHV	SHV-Fe	5'-TTA TCT CCC TGT TAG CCA CC-3'	795 pb
bla SHV	SHV-Re	5'-GAT TTG CTG ATT TCG CTC GG-3'	

Reactivo	Concentración final
Agua	.....
Templado	1 µl
Buffer	1 X
dNTP Mix	0,2 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
SHV-Fe	1 pmol/µl
SHV-Re	1 pmol/µl
Taq	0,025 U/µl

#### Parámetros de ciclado

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94 °C	4 minutos	1
94 °C	1 minuto	X 35
62 °C	1 minuto	
72 °C	1 minuto	
72 °C	7 minutos	1
10 °C	∞	

#### Secuencias de primers CMY

Gen	Primer	Secuencia	Tamaño
bla CMY	CMY-2-Fe	5'-ATG ATG AAA AAA TCG TTA TGC TGC	1117 pb
bla CMY	CMY-2-R	5'-GCT TTT CAA GAA TGC GCC AGG-3'	

**Reactivos Master Mix**

Reactivo	Concentración final
Agua	.....
Templado	1 $\mu$ l
Buffer	1 X
dNTP Mix	0,2 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
CMY-2-Fe	1 pmol/ $\mu$ l
CMY-2-R	1 pmol/ $\mu$ l
Taq	0,025 U/ $\mu$ l

**Parámetros de ciclado**

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	4 minutos	1
94°C	1 minuto	X 35
62 °C	1 minuto	
72 °C	1,20 minuto	
72 °C	10 minutos	1
10 °C	$\infty$	

**8.2.1.2. Secuencia de primers, reacción de PCR y condiciones de termociclador del gen de resistencia a la tetraciclina (*tetA*) (Pantozzi, 2018)**

**Secuencias de primers *tetA***

Gen	Primer	Secuencia	Tamaño
tetA	tetA-F	5'-TTT CGG CGA GGA TCG CTT TCA CTG -3'	283 pb
tetA	tetA-R	5'-ATC CAC CTG CCT GGA CAA CAT TGC -3'	

**Reactivos Master Mix**

Reactivo	Concentración final
Agua	.....
Templado	1 µl
Buffer	1 X
dNTP Mix	0,2 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
tetA F	0,1 µM/µl
tetAR	0,1 µM/µl
Taq	0,025 U/µl

**Parámetros de ciclado**

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	5 minutos	1
95°C	45 segundos	X 35
59 °C	45 segundos	
72 °C	1 minuto	
72 °C	5 minutos	1
4 °C	∞	

**8.2.1.3. Secuencia de primers, reacción de PCR y condiciones de termociclador de genes de resistencia a la colistina (*mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* y *mcr-5*) (Rebelo y col., 2018)**

**Secuencias de primers MCR**

Gen	Primer	Secuencia	Tamaño
bla MCR-1	mcr1_fw	5'-AGTCCGTTTGTCTTGTGGC-3'	320 pb
bla MCR-1	mcr1_rev	5'-AGATCCTTGGTCTCGGCTTG-3'	
bla MCR-2	mcr2_fw	5'-CAAGTGTGTTGGTTCGCAGTT-3'	715 pb
bla MCR-2	mcr2_rev	5'-TCTAGCCCGACAAGCATACC-3'	
bla MCR-3	mcr3_fw	5'-AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG-3'	929 pb
bla MCR-3	mcr3_rev	5'-AATGGAGATCCCCGTTTTT-3'	
bla MCR-4	mcr4_fw	5'-TCACTTTCATCACTGCGTT-3'	1116 pb
bla MCR-4	mcr4_rev	5'-TTGGTCCATGACTACCAATG-3'	
blaMCR-5	MCR5_fw	5'-ATGCGGTTGTCTGCATTATC-3'	1644 pb
blaMCR-5	MCR5_rev	5'-TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG-3'	

**Reactivos Master Mix**

Reactivo	Concentración final
Agua	.....
Templado	2 µl
Master Mix Go Taq	1 X
MCR Mix primers	10 Mm/µl

**Parámetros de ciclado**

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	5 minutos	1
95°C	30 segundos	X 30
55 °C	30 segundos	
72 °C	45 segundos	
72 °C	10 minutos	1
4 °C	∞	

### 8.3. ANEXO 3

**8.3.1. Secuencia de primers, reacción de PCR y condiciones de termociclador del gen de resistencia a antimicrobianos en cepas aisladas de *Enterococcus* spp.**

**8.3.1.1. Secuencia de primers, reacción de PCR y condiciones de termociclador del gen de resistencia a la vancomicina (*vanA*) (Dutka-Malen y col., 1995)**

#### Secuencias de primers VanA

Gen	Primer	Secuencia	Tamaño
vanA	VAN-A-Plus	5'-GGG AAA ACG ACA ATT GC-3'	732 pb
vanA	VAN-A-Minus	5'-GTA CAA TGC GGC CGT TA-3'	

#### Reactivos Master Mix

Reactivo	Concentración final
Agua	.....
Templado	2,5 µl
Buffer	1 X
dNTP Mix	0,2 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
VanA F	0,1 µM/µl
VanA R	0,1 µM/µl
Taq	0,025 U/µl

#### Parámetros de ciclado

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	5 minutos	1
94°C	30 segundos	X 35
48 °C	30 segundos	
72 °C	30 segundos	
72 °C	5 minutos	1
4 °C	∞	

**8.3.1.2. Secuencia de primers, reacción de PCR y condiciones de termociclador del gen de resistencia a la tetraciclina (*tetM*) (Cochetti y col., 2005)**

**Secuencias de primers *tetM***

Gen	Primer	Secuencia	Tamaño
tetM	TETM3	5'- GAACTCGAACAAGAGGAAAGC -3'	740 pb
tetM	TETM4	5'- ATGGAAGCCCAGAAAGGAT-3'	

**Reactivos Master Mix**

Reactivo	Concentración final
Agua	.....
Templado	1 µl
Buffer	1 X
dNTP Mix	0,2 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
TETM3	1 pmol/µl
TETM4	1 pmol/µl
Taq	0,025 U/µl

**Parámetros de ciclado**

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	5 minutos	1
94°C	1 minuto	X 30
58 °C	30 segundos	
72 °C	1 minuto	
72 °C	7 minutos	1
4 °C	∞	

## 8.4. ANEXO 4

### 8.4.1. Análisis Estadístico con el programa WinEpi© (2006)

#### 8.4.1.1. Tabla análisis estadístico de Chi cuadrado para diferencia de proporciones de cepas centinela del estudio

Isla Santa Cruz	% Aislamiento de <i>Escherichia coli</i>	% Aislamiento de <i>Enterococcus</i>	% de Aislamientos de <i>Enterobacter</i>	p-valor
<b>Total</b>	35,42	86,46	53,65	< 0.0001

Interpretación: las proporciones encontradas de cada bacteria en la Isla son diferentes (p= < 0.0001)

#### 8.4.1.2. Tabla análisis estadístico de Chi cuadrado para diferencia de proporciones de cada bacteria centinela según la zona muestreada (p≤ 0,05)

Zona Muestreada	Número de Muestras Analizadas	% Aislamiento de <i>Escherichia coli</i>	% Aislamiento de <i>Enterococcus</i>	% de Aislamientos de <i>Enterobacter</i>
<b>Urbana</b>	128	19,12	40,66	43,69
<b>Agropecuaria</b>	128	47,06	34,34	26,7
<b>Protegida</b>	128	33,82	25	29,61
<b>p- valor</b>		<b>&lt; 0.0001</b>	<b>0.0280</b>	<b>0.0086</b>

**8.4.1.3. Tablas análisis estadístico de Chi cuadrado para diferencia de proporciones encontradas entre *Escherichia coli* y la RAM ( $p \leq 0,05$ )**

Antibiótico	Urbana %	Agropecuaria %	Protegida %	p-valor
Ampicilina	5.15	22	22.79	< 0.0001*
Cefoxitina	2.21	5.88	2.94	0.2347
Cefotaxima	0	0.74	0	0.3646
Cefepime	0	0.74	0.74	0.6031
Gentamicina	0	0	0	----
Tetraciclina	3.68	22.06	5.88	<0.0001*
Trimetoprim Sulfametoxazol	2.94	11.76	3.68	0.0035*
Ciprofloxacina	0.74	2.94	2.94	0.3618
Cloranfenicol	2.21	9.56	2.94	0.0084*

En rojo: la significación de la  $X^2$  no es válida ya que el 50.0% de los resultados esperados son menores de 5.

**8.4.1.4. Tablas análisis estadístico de Chi cuadrado para diferencia de proporciones encontradas entre *Enterococcus spp.* y la RAM ( $p \leq 0,05$ )**

Antibiótico	Urbana %	Agropecuaria %	Protegida %	p-valor
Ampicilina	0.30	0.60	0.90	0.6059
Gentamicina	1.20	0	0	0.0183
Vancomicina	0.60	0.30	0.30	0.7788
Estreptomicina	0.90	4.82	1.20	0.0009*
Teicoplanina	0.60	0.30	0.60	0.8186
Tetraciclina	6.02	9.64	3.92	0.0105*
Ciprofloxacina	1.81	3.61	0.30	0.0076*
Cloranfenicol	1.20	0.30	0.30	0.2225

En rojo: la significación de la  $X^2$  no es válida ya que el 50.0% de los resultados esperados son menores de 5.

**8.4.1.5. Tablas análisis estadístico de Chi cuadrado para diferencia de proporciones encontradas en *Enterobacter* spp. y la RAM ( $p \leq 0,05$ )**

<b>Antibiótico</b>	<b>Urbana %</b>	<b>Agropecuaria %</b>	<b>Protegida %</b>	<b>p-valor</b>
Ampicilina	34.47	24.27	27.18	<b>0.0619*</b>
Cefoxitina	31.07	21.36	23.79	<b>0.0633*</b>
Cefotaxima	5.83	6.31	4.37	<b>0.6493</b>
Cefepime	5.83	5.83	3.40	<b>0.4349</b>
Gentamicina	2.91	2.43	0.97	<b>0.3784</b>
Tetraciclina	3.88	3.40	1.46	<b>0.2943</b>
Trimetoprim Sulfametoxazol	0.49	0	0.97	<b>0.4058</b>
Ciprofloxacina	6.31	4.85	2.43	<b>0.1564</b>
Cloranfenicol	0	1.46	0.49	<b>0.1925</b>

En rojo: la significación de la  $X^2$  no es válida ya que el 50.0% de los resultados esperados .