



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Maestría en Medicina Canina y Felina

“Detección y caracterización fenotípica y molecular de aislados de *Escherichia coli* O157:H7 de origen canino (*Canis lupus familiaris*)”

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Magíster en Medicina Canina y Felina.

Autora:

Betty Lorena Vayas Minango

CI: 1803819323

Correo electrónico: lore_vayas94@yahoo.es

Directora:

Sandra Margarita Cruz Quintana PhD

CI: 1756730238

Cuenca, Ecuador

18-noviembre-2021

**RESUMEN:**

Escherichia coli (*E. coli*) O157:H7 es uno de varios serotipos productores de toxina Shiga que causan enfermedades tanto en humanos como en animales, el organismo probablemente evolucionó a través de la adquisición horizontal de genes para las toxinas Shiga y otros factores de virulencia. El objetivo fue detectar y caracterizar fenotípica y molecularmente aislados de *E. coli* O157:H7 de origen canino (*Canis lupus familiaris*), se partió de un banco de cepas de *E. coli* (n = 122) para la detección del serotipo O157:H7 obteniendo 4 muestras positivas, los genes de virulencia hallados en el total de las muestras fueron en primera instancia *eaeA* 5.74% y *hlyA* 0.82%, para el caso de *stx1* y *stx2* no se obtuvieron resultados positivos. Se profundizó en la investigación con la transconjugación de bacterias donadoras y receptoras (Cepa J53) por medio de cultivos, una vez obtenidas las colonias, se realizó los transconjugados con cada bacteria positiva para *E. coli* O157:H7 y sus respectivos transconjugados (n = 9); se evaluaron los genes de virulencia en el caso de *eaeA* 88.88%, *hlyA* 44.44%, y genes de resistencia como: *TetA* 22.22%, *bla_{TEM}* 77.77%, *bla_{CTX-M}* 88.88% por medio de la técnica PCR. Para la detección de los perfiles de resistencia de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y betalactamasas de tipo AmpC se realizó el método de difusión en disco “Kirby&Bauer” mostrando ser positivas las 8 cepas bacterianas tanto para BLEE como para AmpC; además de hallar resistencia fenotípica para: Cefotaxime 55%, Ciprofloxacina 33%, Enrofloxacina, 44%, Sulfametoxazol/Trimetropim 44%, Ampicilina, Vancomicina y Eritromicina 88%. Este estudio proporciona información acerca de la prevalencia de resistencia antimicrobiana en perros del centro del país.

Palabras Clave: Canino. Kirby Bauer. PCR. Transconjugados. Resistencia antimicrobiana. *Escherichia coli* O157:H7.



ABSTRACT:

Escherichia coli (*E. coli*) O157: H7 is one of several Shiga toxin-producing serotypes that cause disease in both humans and animals, the organism likely evolved through horizontal acquisition of genes for Shiga toxins and other virulence factors. The objective was to detect and characterize phenotypically and molecularly isolates of *E. coli* O157: H7 of canine origin (*Canis lupus familiaris*), starting from a bank of *E. coli* strains (n = 122) for the detection of serotype O157: H7 obtaining 4 positive samples, the virulence genes found in the total of the samples were *eaeA* 5.74% and *hlyA* 0.82% in the first instance, for the case of *stx1* and *stx2* no positive results were obtained. The investigation was deepened with the transconjugation of donor and receptor bacteria (Strain J53) by means of cultures, once the colonies were obtained, the transconjugates were carried out with each positive bacterium for *E. coli* O157: H7 and their respective transconjugates (n = 9); Virulence genes were evaluated in the case of *eaeA* 88.88%, *hlyA* 44.44%, and resistance genes such as: *TetA* 22.22%, *bla_{TEM}* 77.77%, *bla_{CTX-M}* 88.88% by means of the PCR technique. For the detection of the resistance profiles of extended spectrum beta-lactamases (ESBL) and AmpC-type beta-lactamases, the "Kirby & Bauer" disk diffusion method was performed, showing the 8 bacterial strains to be positive for both ESBL and AmpC; in addition to finding phenotypic resistance for: Cefotaxime 55%, Ciprofloxacin 33%, Enrofloxacin, 44%, Sulfamethoxazole / Trimetropim 44%, Ampicillin, Vancomycin and Erythromycin 88%. This study provides information about the prevalence of antimicrobial resistance in dogs from the center of the country.

Keywords: Canine, Kirby Bauer. PCR. Transconjugates. Antimicrobial Resistance. *Escherichia coli* O157: H7.



Índice del Trabajo

RESUMEN:	2
INDICE DE TABLAS	6
CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	7
CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL	Error! Bookmark not defined.
AGRADECIMIENTO	9
DEDICATORIA	10
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	11
OBJETIVOS	13
1.1. Objetivo General:	13
1.2. Objetivos Específicos:	13
CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	14
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1. Ubicación del lugar de investigación.	27
3.2. Ubicación del laboratorio.	27
3.3. Caracterización de unidad experimental.	27
3.4. Metodología.	28
3.4.1. Obtención de aislados de <i>E. coli</i> en caninos de la ciudad de Ambato.	28
3.5 Preparación de soluciones, tampones y medios de aislamiento.	28
3.5.1.3.1 Caldo Triptona Soya (TSB).	29
3.5.1.3.2 Luria Bertani (LB).	29
3.5.1.3.3 Agar Mueller-Hinton.	29
3.5.1.3.4 Agar Mueller-Hinton + Azida+ cefotixina.	30
3.5.1.3.5 Agar Mc. Conkey.	30
3.5.1.3.6 TBE.	30
3.5.1.3.7 Gel de agarosa.	31
3.6. Preparación del inóculo.	31
3.7. Almacenamiento de colonias bacterianas.	32
3.8. Extracción de DNA bacteriano (método de choque térmico).	33
3.9. Electroforesis en gel de agarosa.	34
3.10. Amplificación de genes de resistencia mediante PCR.	36
3.11. Visualización de las amplificaciones.	38
3.12. Transferencia por conjugación:	38
3.13. Colocación de los discos de antibióticos.	40
3.10. Panel de antibióticos utilizado.	41
3.11. Caracterización de bacterias con fenotipo BLEE y AmpC.	42
3.11.1. BLEE.	42



3.11.2. AmpC.....	43
3.12. Variables:	43
3.12.1 Variable independiente:	43
3.12.2 Variable dependiente:	43
3.13. Diseño de investigación:	43
3.14. VARIABLES RESPUESTA.....	44
3.15.1. Medición y lectura de halos de inhibición del antibiograma.....	45
3.15.2. Interpretación de resultados del antibiograma.	45
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	55
6.1. Conclusiones.....	55
6.2 Recomendaciones.....	56
CAPÍTULO VII: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	57
VIII: ANEXOS	64



INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Cepas control utilizadas en la amplificación de los genes de resistencia.</i>	<i>36</i>
<i>Tabla 2. Primera para amplificación de genes que codifican factores de virulencia utilizados en este estudio.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabla 3. Panel de antibióticos.</i>	<i>41</i>
<i>Tabla 4. Antibióticos seleccionados para BLEE</i>	<i>42</i>
<i>Tabla 5. Antibióticos seleccionados para AmpC.....</i>	<i>42</i>
<i>Tabla 6. Interpretación de halos de inhibición. (Dejar los 3 que salieron resistentes) ANEXO.....</i>	Error! Bookmark not defined.
<i>Tabla 7. Aislados de Esherichia coli positivos al serotipo O157:H7.</i>	<i>46</i>
<i>Tabla 8. Aislados de E. coli positivos para los diferentes genes.</i>	<i>47</i>
<i>Tabla 9. Genes de resistencia y virulencia.</i>	<i>48</i>
<i>Tabla 10. Presencia de genes de resistencia y virulencia identificados mediante PCR.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabla 11. Número de cepas de E.coli O157:H7 resistente al panel de antibióticos.</i>	<i>51</i>
<i>Tabla 12. Aislados de E. coli O157:H7 positivos para los diferentes genes.</i>	<i>53</i>



Cláusula de Propiedad Intelectual

Betty Lorena Vayas Minango, autora del trabajo de titulación "Detección y caracterización fenotípica y molecular de aislados de *Escherichia coli* O157:H7 de origen canino (*Canis lupus familiaris*)", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 18 de Noviembre del 2021

Betty Lorena Vayas Minango

C.I: 1803819331



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Betty Lorena Vayas Minango en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Detección y caracterización fenotípica y molecular de aislados de *Escherichia coli* O157:H7 de origen canino (*Canis lupus familiares*)", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 18 de Noviembre del 2021

Betty Lorena Vayas Minango

C.I: 1803819331



AGRADECIMIENTO

Primero que todo dar gracias a Dios por permitirme culminar un escalón más de mi vida profesional, a mis padres por ser siempre ese apoyo incondicional en todo momento, a mi esposo y a mi hija que gracias a ustedes soy lo que soy y estoy donde estoy muchísimas gracias, sin olvidarme de mi hermana muchas gracias ñaña porque gracias a ti que me guiaste desde muy pequeña puedo decir que estoy donde estoy te amo mucho ñañis.

Al doctor Calero por ser siempre ese apoyo incondicional y por transmitirme los conocimientos a la Dra. Sandra Cruz por ayudarme en todo lo que fue necesario sin ustedes este trabajo de tesis no se habría logrado muchísimas gracias.

Además un agradecimiento muy especial a la Universidad de Cuenca que me recibió y supo forjar más conocimientos en mí, al doctor Vallecillo muchas gracias doctor por todo lo que me ayudó estaré siempre agradecida con usted de igual manera a la doctora Méndez que pese a ser mi tribunal siempre estuvieron prestos para escucharme y saber guiarme en los pasos finales de la tesis infinitamente agradecida con ustedes.

Si olvidarme de esas bellas amistades que uno se forja en el camino gracias amigas por ser las personas que me alentaban a cada momento amistades que encontré en este camino que estoy segura que jamás se van a perder.



DEDICATORIA

“El precio de la grandeza es la responsabilidad”

(Winston Churchill)

A Dios porque siempre estuvo conmigo en el camino y siempre estará ahí.



CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

E. coli es miembro de la familia Enterobacteriaceae y es parte de la microbiota del intestino grueso de los animales y seres humanos (Vega-Manriquez et al., 2020). La posibilidad de obtener componentes genéticos por transferencia horizontal dió lugar al surgimiento de cepas patógenas que han sido categorizadas como intestinales o extraintestinales y que son responsables de diferentes cuadros clínicos (Cundon et al., 2018).

Las *E. coli* Shiga toxigénica productoras de toxinas (STEC) junto con los demás variedades son bacterias Gram-negativas, en forma de barra. Sin embargo las STEC son caracterizadas por la producción de toxinas Shiga (Stx). Dependiendo de la referencia citada, hay 200 a 400 serotipos STEC, muchos de los cuales no han sido implicados en enfermedades humanas. Sin embargo, un subconjunto de *E. coli* entero hemorrágica (EHEC), O157: H7 son actualmente las cepas más predominantes y representan aproximadamente el 75% de las infecciones de *E. coli* entero hemorrágicas (EHEC) en todo el mundo, otros serotipos O157 EHEC están surgiendo como una causa de las enfermedades transmitidas por los alimentos (Tiffer, 2016).

El uso inadecuado de antibióticos para el tratamiento de diferentes tipos de infecciones causadas por diversos patógenos han originado una preocupación a nivel mundial (OMS, 2016). Esto se debe principalmente al incremento de la multiresistencia de los diferentes patógenos que causan infecciones comunes; en particular aquellos responsables de la enfermedad diarreica como STEC (Egas, 2016).



Para determinar la susceptibilidad de una bacteria a un agente existen métodos de evaluación de sensibilidad antibacteriana que ayudan a los médicos veterinarios a determinar los antibióticos más apropiados para un tratamiento (Sánchez, 2018). El Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) proporciona recomendaciones para agentes antibacterianos frente a diferentes enfermedades y especies animales (CLSI, 2020). Es necesario saber interpretar los resultados que pueden ser cuantitativos y cualitativos. La técnica de difusión en agar o Técnica de Kirby Bauer es un método cualitativo y sus resultados se pueden denominar de la siguiente manera: sensible, intermedio o resistente, útil en bacterias de crecimiento rápido. La concentración inhibitoria mínima (MIC) es un método cuantitativo que define la mínima concentración de antibiótico que en un período de tiempo, es capaz de inhibir el crecimiento de un inóculo bacteriano previamente estandarizado (Gastelo-Acosta et al., 2016). Así mismo para determinar la presencia de genes de resistencia se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la cual reproduce *in vitro* el proceso fisiológico de la duplicación del ADN en las células, amplificando exponencialmente una secuencia específica de ADN bicatenario (Muñoz, 2020).

Dado que STEC es reservorio potencial de genes de resistencia a los antimicrobianos, su presencia en las heces de los perros representa una seria amenaza para la salud pública, los dueños y cuidadores de perros, como los niños y los veterinarios, corren un mayor riesgo porque tienen contacto directo con estos animales (Vega-Manriquez et al., 2020). En el Ecuador, las diarreas de tipo infecciosa representan la sexta causa de muerte en personas (Egas, 2016), es por eso que la caracterización de los determinantes de virulencia y resistencia antibacteriana en los aislados de *E. coli* es necesaria para el tratamiento empírico de las infecciones asociadas con estos organismos (Torkan et al., 2016). Es por ese motivo que el objetivo del trabajo fue detectar y caracterizar de manera fenotípica y molecular los aislados de *Escherichia coli* O157:H7 de origen canino (*Canis lupus familiaris*).



OBJETIVOS

1.1. Objetivo General:

Detectar y caracterizar fenotípica y molecularmente aislados de *Escherichia coli* O157:H7 de origen canino (*Canis lupus familiaris*)

1.2. Objetivos Específicos:

1.2.1 Identificar la presencia de *E. coli* O157:H7 en aislados de origen canino mediante PCR.

1.2.2. Detectar la presencia de genes de virulencia asociados a toxina Shiga (*stx1*, *stx2*), intimina (*eaeA*) y la enterohemolisina codificada en plásmidos (*hlyA*) de las muestras de *E.coli* y de las muestras de *E.coli* O157:H7 mediante PCR.

1.2.3. Evaluar el potencial de transconjugación de los plásmidos de virulencia y mecanismos de resistencia a través de medios de cultivo.

1.2.4. Detectar los perfiles de resistencia a antibióticos, fenotípicos y genotípicos, en los clones positivos y transconjugados por la utilización de medios de cultivo.

Pregunta de Investigación

¿Existen diferencias entre los perfiles de resistencia fenotípica y genotípica de *Escherichia coli* O157:H7 de origen canino (*Canis lupus familiaris*)?



CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Escherichia coli.

Es un anaerobio facultativo Gram negativo (bacilo) de la familia Enterobacteriaceae de tipo fermentador. Son bacilos tanto no móviles como móviles por flagelos peritricosos (flagelos distribuidos uniformemente en la superficie bacteriana) siendo el mayor colonizador del intestino grueso (Aguilar-Zapata, 2015).

Es una bacteria comensal que forma parte de la microbiota del intestino de humanos y animales, la mayoría de las *E. coli* son inocuas para la población humana; sin embargo, existen grupos que pueden causar enfermedades, tales como las *E. coli* diarreogénicas entre ellas, las denominadas *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* Enteroinvasora (EIEC), *E. coli* Enteropatógena (EPEC), *E. coli* Enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* productora de Shiga Toxin (STEC) las cuales son capaces de ocasionar cuadros clínicos de importancia en la población, especialmente niños y ancianos, en los que puede generar daño renal o incluso causar la muerte (Rojas, 2018).

STEC.

Afecta a individuos que comienzan con sintomatología de heces blandas a sanguinolentas siendo considerada un patógeno entérico que provoca zoonosis (transmisión de animales a humanos) de importancia en salud pública, pertenece al serogrupo O157:H7, se ha aislado de canales de riego, que son considerados una fuente de contaminación para frutas, verduras frescas y



recién cortadas, que se consumen con frecuencia sin ninguna intervención para eliminar los patógenos potenciales transmitidos por alimentos (Haymaker et al., 2019).

Serotipificación.

Es una clasificación que se aplica a bacterias Gram negativas; fue desarrollada por Kauffman, realizó un esquema de serotipificación basado en la identificación de los antígenos O (de las cadenas de polisacáridos del lipopolisacárido), de los antígenos H (pertenecientes a la proteína flagelina encontrada en los flagelos) y del antígeno K (que pertenece a los componentes de la cápsula bacteriana); la serotipificación del antígeno O proporciona el serogrupo y en conjunto con el antígeno H proporcionan el serotipo (O:H); la serotipificación es importante porque ayuda a distinguir el número de serogrupos de *E. coli* que pueden causar enfermedad (Joensen et al., 2015).

El serotipo O:H es crucial en la detección de brotes, vigilancia epidemiológica, diferenciación taxonómica de *E. coli*, detección de serotipos patógenos dentro de la especie y estudios clonales y evolutivos, además proporciona información que está asociada con la respuesta antigénica (Joensen et al., 2015).

Genes de virulencia.

Los principales genes de virulencia de STEC son los que codifican para las toxinas tipo Shiga (*stx1*, *stx2* y sus variantes) responsables del daño del endotelio vascular sistémico, los cuales se encuentran en un prófago integrado al cromosoma bacteriano y que han sido asociados al desarrollo del Síndrome urémico (SUH). Otro de los genes de virulencia localizado en el locus LEE



(locus de efusión en enterocitos) es el gen *eaeA* que codifica para la intimina y que es necesario para el proceso de la adherencia a las células epiteliales del intestino humano y borrado de vellosidades intestinales y una potente enterohemolisina (*ehxA*) codificada en un megaplásmido.

Otros genes que se han propuesto como factores de virulencia se encuentran en plásmidos, siendo uno de ellos el gen para la enterohemolisina (*hlyA*), ubicado en el plásmido O157 cuyo principal rol es el de lisar células endoteliales liberando Hierro el que queda disponible para ser utilizado por las células bacterianas (Rojas, 2018).

Resistencia a los antibióticos.

La plasticidad del genoma de *E. coli* y su habilidad para movilizar y adquirir elementos genéticos le permite emerger como una bacteria que provoca nuevas epidemias debido a la adquisición de factores de virulencia y resistencia a los antibióticos (Torres, 2016).

Las diferentes cepas de *E. coli* pueden obtener resistencia a los antibióticos a través de varios mecanismos los cuales se pueden agrupar en estas categorías:

- 1) Inactivación enzimática: se producen enzimas que inactivan al antibiótico mediante hidrólisis, acetilaciones, adenilaciones o fosforilaciones.
- 2) Modificaciones en el sitio blanco: Mutaciones genéticas que provocan un cambio a nivel estructural en las proteínas blanco del antibiótico, adquisición de genes que codifican para sustitutos del blanco original de los antibióticos o formar una vía metabólica alterna desviando la reacción que es inhibida por el antibiótico.



- 3) Alteraciones de la permeabilidad: la membrana externa de los Gram negativos es impermeable a sustancias hidrofílicas y este tipo de antibióticos está obligado a pasar mediante porinas por lo que la disminución de la expresión, la alteración estructural y la disminución del tamaño de dichas porinas disminuye el influjo del antibiótico. Además, también se puede alterar la entrada de aminoglucósidos dependientes de energía mediante modificaciones del gradiente electroquímico dificultando la entrada a la célula.
- 4) Bombas de eflujo: este mecanismo afecta a diferentes grupos de antibióticos, mediante diferentes proteínas que funcionan como bombas de eflujo exportando las moléculas de los antibióticos desde el citoplasma hacia el exterior de la célula (Carreón, 2019).

Resistencia a los antibióticos betalactámicos.

El mecanismo más común de resistencia contra antibióticos β -lactámicos entre enterobacterias es la producción de β -lactamasas, que son enzimas que inactivan los antibióticos β -lactámicos y que pertenecen a la misma familia de las Serin proteasas de las PBP (Proteínas de unión a penicilina por sus siglas en inglés) (Murray et al., 2013).

β -lactamasas de espectro extendido.

La resistencia a Cefalosporinas de última generación es principalmente conferida por enzimas conocidas como β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), que hidrolizan Penicilinas, Cefalosporinas de tercera y cuarta generación y Monobactámicos; estas enzimas son capaces de hidrolizar el enlace amida del anillo β -lactámico y pueden ser inhibidas por Ácido clavulánico, Sulbactam y Tazobactam. La mayoría de las BLEE han evolucionado como resultado de mutaciones en el centro activo de las β -lactamasas; estas mutaciones de la secuencia de



aminoácidos les permiten mejorar su capacidad de hidrólisis frente a β -lactámicos y esto ocurre por la presión selectiva ejercida del amplio e indiscriminado uso de antibióticos β -lactámicos como las Cefalosporinas de tercera y cuarta generación (Bajaj et al., 2016).

β -lactamasas tipo SHV (Clase A).

Las Betalactamas del tipo SHV tienen más prevalencia en Estados Unidos y Europa con cerca de 60 variantes de SHV, habitualmente se encuentra más en *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) con un 20% de resistencia a Ampicilina, pero también se han encontrado en *E. coli* y *Pseudomona aeruginosa* (*P. aeruginosa*) (Pérez, 2017).

β -lactamasas tipo CTX-M (Clase A).

Las Betalactamasas del tipo CTX-M se han reportado más en Sudamérica y Europa del Este con cerca de 80 tipos, en los que *Salmonella entérica* serovar *typhimurium* y *E. coli* son las bacterias en las que más se encuentra, este tipo de Betalactamasas tiene afinidad por la resistencia a los antibióticos como la Cefotaxima, Cefuroxima y Cefepime (Pérez, 2017).

β -lactamasa AmpC.

Las β -lactamasas tipo AmpC pertenecen a la clase C de Ambler y al grupo funcional 1, en muchos géneros bacterianos el gen se encuentra en el cromosoma de la bacteria como es el caso de *E. coli* y es inducible mediante un sistema de regulación donde se encuentran los genes *ampD*, *ampG*, *ampR* e intermediarios del reciclaje de peptidoglicanos. También se han descrito algunas AmpC que se encuentran en plásmidos y por lo tanto presentan la capacidad de transferirse



horizontalmente entre bacterias, la mayoría de estas enzimas codificadas en plásmidos se encuentran entre las enterobacterias mayormente en *K. pneumoniae* y *E. coli* causantes de infecciones nosocomiales (Carreón, 2019)

En la mayoría del género de la familia Enterobacteriaceae las β -lactamasas tipo AmpC son clínicamente significativas ya que se caracterizan por conferir resistencia a una gran variedad de antibióticos β -lactámicos como las Penicilinas y Cefalosporinas de primera y segunda generación incluyendo Cefamicinas y en menor medida las de tercera generación, pero no son capaces de conferir resistencia a las Cefalosporinas de cuarta generación ni a los carbapenémicos (Calvo et al., 2011).

El Aztreonam, la Cloxacilina y el Ácido borónico poseen la propiedad de inhibir las β -lactamasas tipo AmpC pero no son afectadas por los inhibidores de las β -lactamasas como por el Clavulanato, Sulbactam y Tazobactam (Calvo et al., 2011).

Las opciones durante el tratamiento de infecciones causadas por Enterobacterias que expresan β -lactamasas tipo AmpC son limitadas, en especial las plasmídicas porque pueden dar lugar a fracasos terapéuticos en el tratamiento con β -lactámicos y se asocian a una gran resistencia a múltiples fármacos, además las β -lactamasas AmpC plasmídicas pueden transferirse o diseminarse en el ambiente nosocomial como en la comunidad (Pérez, 2017).



Determinación fenotípica de perfiles de resistencia.

En los laboratorios médicos y veterinarios alrededor del mundo se ha estandarizado el método para la evaluación de la susceptibilidad de una bacteria frente a antibióticos, lo cual es establecido por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). La evaluación de los perfiles fenotípicos tiene la finalidad de valorar el desarrollo de nuevos perfiles de resistencia, los cuales evolucionan de manera temporal y geográfica, por lo tanto, es crucial el seguimiento epidemiológico y clínico de los mismos (Akhtar et al., 2018).

Técnica de difusión en agar.

Este es un método cualitativo, fácilmente estandarizable e indicado para microorganismos no exigentes de crecimiento rápido. Para esto se utiliza la técnica de aislamiento en placas Petri que contenían un medio adecuado para la cepa en estudio (al cual además se le otorgaron condiciones atmosféricas específicas). El antibiograma por disco difusión basado en el trabajo de Kirby & Bauer, es uno de los métodos que el CLSI recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos (Fehlberg et al., 2016; Mohammad et al., 2016).

Interpretación de los resultados.

Los resultados de sensibilidad se definen en tres categorías según normas del CLSI:

- 1) Sensible (S): Significa que hay una alta probabilidad de que el paciente responda al tratamiento con el antibiótico testado.
- 2) Intermedio (I): Con agentes que se puede administrar, se deben utilizar altas dosis para que el tratamiento sea eficaz o que el agente llegue a ser eficaz si se concentra en el sitio de



infección. También puede representar una zona buffer que impide que cepas con límite de sensibilidad (es decir, que son “muy sensibles”) sean categorizadas como resistentes.

- 3) Resistente (R): Implica que no habrá un resultado clínico favorable, porque las concentraciones sistémicas alcanzables del agente serán más bajas que la del microorganismo causal con programas de dosificación normales y / o bajas en el intervalo o cuando es probable que existan mecanismos específicos de resistencia microbiana (CLSI, 2013).

Medición de tamaños de zona.

Todas las mediciones se realizan a simple vista mientras se ve la parte posterior de la placa de Petri. Sosteniendo la placa unos centímetros sobre una superficie negra no reflectante iluminada con luz reflejada. Mirando la placa, usando una línea de visión directa y vertical para evitar cualquier paralaje que provocase una lectura incorrecta. Si la ubicación del disco o el tamaño de la zona no permite leer el diámetro de la zona, se mide desde el centro del disco hasta un punto en la circunferencia de la zona donde estuviese presente un borde distinto (el radio) y multiplicarlo por 2 para determinar el diámetro (Hudzicki, 2009).

Cambios genéticos en bacterias

Los cambios genéticos que se pueden transferir por herencia entre las bacterias se dan por dos mecanismos principales: el primero se relaciona con las mutaciones en el ADN codificante de moléculas diana y el segundo se refiere a la adquisición de nuevo material genético. Los métodos por los cuales se da la transferencia de material genético entre microorganismos son tres: transformación, transducción y conjugación (Burmeister, 2015) (Figura 1)

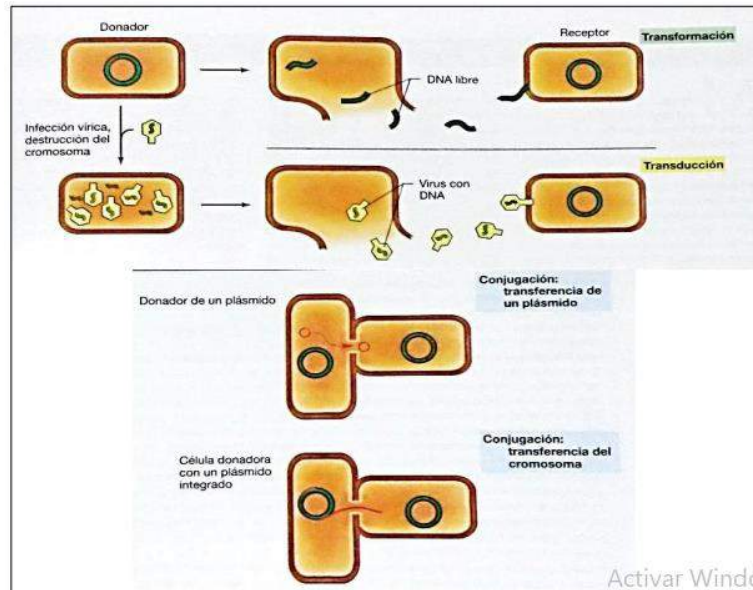


Figura 1. Mecanismos genéticos de transferencia horizontal de genes. Transformación, transducción y conjugación. Tomado de (Abrahamoich 2018).

Mecanismos de transferencia horizontal de genes en bacterias

La transformación bacteriana se la entiende como aquel proceso en el cual ADN libre ingresa a la célula del microorganismo; aquellos microorganismos capaces de transformarse son conocidos como competentes. Existen varias estructuras que utilizan los microorganismos para transferir material genético, en este caso genes de resistencia a un antibiótico. Los genes de resistencia pueden ser transferidos entre bacterias pertenecientes a diferentes grupos filogenético mediante elementos móviles tales como bacteriófagos, plásmidos, ADN desnudo, mediante transposones o por cassetes que forman parte de integrones (Valencia, 2009).

Los cassetes genéticos constituyen un grupo diverso de pequeños elementos móviles que usualmente contienen sólo un marco de lectura abierta completo sin promotor y presentan un sitio de recombinación específico. Estos cassetes pueden codificar múltiples resistencias a antibióticos (Valencia, 2009)



Los plásmidos son aquellos elementos que mueven varios genes desde una célula bacteriana hacia otra y constituye uno de los principales mecanismos de transferencia horizontal de genes (plásmidos conjugativos). Los plásmidos pueden portar una gran cantidad de genes que confieren a los organismos resistencia a antibióticos, resistencia a compuestos tóxicos tales como metales pesados, factores de virulencia, enzimas que confieren la capacidad de reparación del ADN o que amplíen el rango de alimentación (Valencia, 2009).

Transformación

Es el proceso por el cual ciertas bacterias, son capaces de incorporar ADN exógeno proveniente de otras bacterias, el cual está libre en el medio circundante. El mecanismo por el cual estas bacterias puede captar el ADN exógeno, conservarlo en forma estable e interactuar con él, se denomina competencia y competentes a las bacterias que lo poseen. Este fenómeno depende de la presencia de un sistema específico de captación de ADN asociado a la membrana. Aunque la mayoría de las bacterias no presentan capacidad natural para captar ADN, es posible inducir en el laboratorio la competencia y también bajo condiciones ambientales particulares, generando distorsiones en la membrana celular por distintos medios; por ejemplo, con pulsos eléctricos (electroporación) o con cambios osmóticos y térmicos (Gutierrez et al., 2015).

Transducción

Es la movilización de ADN de una bacteria a otra por intermedio de un bacteriófago. Existen dos formas de transducción, la especializada y la generalizada. La primera ocurre cuando un fago temperado porta genes bacterianos adquiridos durante un ciclo infeccioso anterior y al infectar una



nueva bacteria e integrar su genoma al cromosoma bacteriano, incorporará a éste la información genética correspondiente a la bacteria infectada previamente. La transducción generalizada se produce por partículas virales defectuosas que se originan como cápsides vacías durante la replicación viral y que luego incorporan ADN de una bacteria; así, al infectar una nueva bacteria podrá introducir en ella dicho material genético (Redondo, 2016).

Conjugación.

Proceso mediado por plásmidos, que tienen la propiedad de transferirse de una célula a otra gracias a un contacto cercano entre ambas células mediante el pili sexual. Los plásmidos son elementos genéticos de forma circular que pueden ser movilizados, poseen replicación propia; es decir, independiente de la replicación del cromosoma bacteriano. Dentro de su información poseen cassetes génicos que codifican para resistencia bacteriana (Redondo, 2016).

Al mezclar las bacterias en un medio líquido o en una placa de agar, los “mensajes” de ADN se van a transmitir de una célula donadora a otra receptora gracias a la conjugación, así sucesivamente, propagando la señal. Los plásmidos que contienen la maquinaria de conjugación, son grandes del orden de 60-100 kb. Estos plásmidos codifican toda la información necesaria para que se lleve a cabo la conjugación, incluyendo la formación de los pili y previniendo futuras conjugaciones innecesarias, bloqueando la membrana. Este bloqueo se produce entre células con un mismo tipo de plásmido, permitiéndose la conjugación entre células con distintos tipos de plásmido.

Así, una célula con un plásmido de tipo F se puede conjugarse con otra cuyo plásmido es de tipo R y viceversa (véase la Figura 2) (Pardilla, 2017).

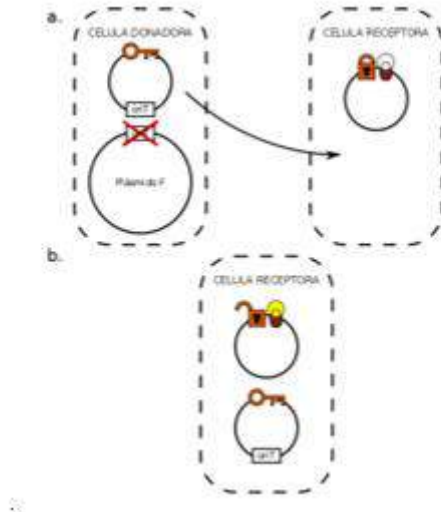


Figura 2.Proceso de Conjugación.

La bacteria de la izquierda (a) es la bacteria donadora. Contiene dos plásmidos, uno el plásmido F que incluye todos los elementos necesarios para realizar la conjugación, excepto la secuencia $oriT$, y otro el plásmido mensajero que contiene la secuencia llave y la secuencia $oriT$. La bacteria de la derecha, es la bacteria receptora. Contiene un plásmido, que contiene la secuencia cerradura y un gen que expresa una proteína de fluorescencia. Después de conjugarse, la bacteria receptora, tiene un plásmido más (b) el plásmido transferido por la bacteria donadora. Si en este plásmido la llave es complementaria a la cerradura, se expresará el gen que contiene la proteína de fluorescencia. Obtenido con permiso de: (Universidad de Berkeley & IGEM, 2006).



REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA (PCR)

Es un método de amplificación de ácidos nucleicos fundamental para la biología molecular y es la más importante técnica molecular práctica para el laboratorio de investigación. Actualmente, existen diversas técnicas de termociclado e isoterma para la amplificación de ácidos nucleicos. Las técnicas de termociclado utilizan ciclos de temperatura para impulsar la síntesis de ADN para generar grandes cantidades de ADN recién sintetizado en proporción a la cantidad original de ADN base.

Las hebras de ADN base se amplifican mediante los ciclos repetidos de dos o tres pasos de temperatura que incluyen:

1. Desnaturalización por calor (Desnaturalización de una plantilla de ADN de doble hebra en hebras simples).
2. Hibridación (Hibridación de cebadores en una plantilla de ADN de una sola hebra).
3. Reacción de extensión (Alargamiento de cebadores por ADN polimerasa)

Como la mayoría de las técnicas de PCR requieren dos moléculas de cebador para amplificar una pieza específica de ADN en una reacción, las temperaturas de fusión de ambos cebadores deben ser muy similares para permitir unión adecuada de ambos a una temperatura de hibridación similar (Kalendar et al., 2017)



CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del lugar de investigación.

Se utilizaron muestras de 3 diferentes clínicas veterinarias pertenecientes a la ciudad de Ambato, provincia del Tungurahua (nombres no revelados por concepto de confidencialidad) y del Hospital Veterinario de la Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias Agropecuarias.

3.2. Ubicación del laboratorio.

La experimentación de este estudio se llevó a cabo en los laboratorios de investigación de bacteriología, química, laboratorio de microbiología ambiental y agrícola y biología molecular, pertenecientes al Centro de Investigaciones Agropecuarias de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, ubicada en el sector Querochaca, cantón Cevallos, provincia de Tungurahua, ubicado a 19 km de la ciudad de Ambato.

3.3. Caracterización de unidad experimental.

La presente investigación parte del estudio realizado por (Núñez, 2018) “Determinación de la presencia de genes de resistencia a antibióticos emergentes en aislados de *Escherichia coli* en caninos de la ciudad de Ambato”, para esto se tomó 122 muestras del banco de cepas de los cuales los factores de estudio fueron: identificación de serotipo O157:H7, genes de virulencia: *stx1*, *stx2*, *eae*, *hlyA*, genes de resistencia: *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *tetA*, *sul-1*, *QnrA*, *QnrS*, *bla_{CMY}*, perfiles fenotípicos y genotípicos BLEE y AmpC.



3.4. Metodología.

3.4.1. Obtención de aislados de *E. coli* en caninos de la ciudad de Ambato.

3.4.1.1 Procedimiento

Las cepas que se utilizaron en la investigación n=122 fueron previamente obtenidas a partir de hisopados rectales de perros provenientes de clínicas veterinarias y refugios de perros callejeros.

3.5 Preparación de soluciones, tampones y medios de aislamiento.

3.5.1.1 Materiales físicos

Guantes de látex descartables

Matraz de 300 ml

Pipetas x 10 ml

Gradilla

Puntas para pipetas

Tubos de ensayo

Cajas Petri

Probetas

3.5.1.2 Materiales químicos (Reactivos de laboratorio)

Caldo Tripón Soya (TSB)

LB (Luria Bertani)



Agar Mueller-Hinton

Azida

Cefotixina

Agar Mc. Conkey

TBE

Gel de agarosa

3.5.1.3 Procedimiento

3.5.1.3.1 Caldo Triptona Soya (TSB).

- Se suspendió 30 g del caldo en un litro de agua destilada.
- Se mezcló en la platina de calentamiento hasta disolverlo.
- Se esterilizó en el autoclave a 121°C durante 15 minutos (Quishpe, 2019).

3.5.1.3.2 Luria Bertani (LB).

- Se rehidrató 20 g del medio en un litro de agua destilada.
- Se dejó reposar 10 a 15 minutos.
- Se calentó agitando frecuentemente hasta completar la disolución.
- Se distribuyó en tubos de ensayo.
- Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- Se conservó en refrigeración de 2° a 8°C (Cabra et al., 2018).

3.5.1.3.3 Agar Mueller-Hinton.

- Se suspendió 38 g del medio en un litro de agua destilada.



- Se calentó en la platina de calentamiento, agitando frecuentemente y se hirvió por un minuto.
- Se esterilizó en la autoclave a 121 ° C durante 15 minutos, y se enfrió a 45-50°C.
- En la Cabina de Flujo Laminar por bioseguridad, se dispensó entre 20 y 25 ml del agar en placas Petri previamente autoclavadas (una para cada organismo a analizarse), y se dejó secar durante 10 minutos antes de taparlas, colocándolas con la tapa hacia abajo (Racines, 2016).

3.5.1.3.4 Agar Mueller-Hinton + Azida+ cefotixina.

- Se suspendió 38 g del medio en un litro de agua destilada.
- Se calentó en la platina de calentamiento, agitando frecuentemente y se hirvió por un minuto.
- Se esterilizó en la autoclave a 121 ° C durante 15 minutos, y se enfrió a 45-50°C.
- En la Cabina de Flujo Laminar, se añadió a la solución 100 mg/ml de azida y 20 mg/L de cefotixina y se dispensó entre 20-25 ml del agar en placas previamente autoclavadas (una para cada organismo a analizarse), y se dejó secar durante 10 minutos antes de taparlas, colocándolas con la tapa hacia abajo (Arrieche, 2016; Velecela, 2017).

3.5.1.3.5 Agar Mc. Conkey.

- Se midió 50 g por cada 1000 ml de agua destilada.
- Se calentó en la platina de calentamiento, agitando frecuentemente y se hirvió por un minuto.
- Se esterilizó en la autoclave a 121 ° C durante 15 minutos, y se enfrió a 45-50°C.
- En la cabina de flujo laminar, se dispensó entre 20 a 25 ml del agar en placas Petri previamente autoclavadas (una para cada organismo a analizarse), y se dejó secar durante 10 minutos antes de taparlas, colocándolas con la tapa hacia abajo.
- Finalmente se dejó en refrigeración (Calipuy et al., 2018).

3.5.1.3.6 TBE.

- Con una probeta se midió 100 ml TBE 10X.



- Se colocó el TBE en 900 ml, agua bidestilada estéril y se agitó (Calero, 2016).

3.5.1.3.7 Gel de agarosa.

- Se tomó 100 ml de TBE en una probeta.
- Se colocó 1 g de agarosa grado molecular (1% p/v) (Calero, 2016).

3.6. Preparación del inóculo.

3.6.1 Materiales físicos

Asa de inoculación.

Micropipeta.

Puntas para micropipetas.

3.6.2 Materiales químicos (Reactivos de laboratorio)

TSB.

3.6.3 Materiales biológicos

Muestras criopreservadas.

3.6.4 Equipos

Incubadora

Escala de Mc. Farland

3.6.5 Procedimiento

- Mediante el uso de un asa o aguja de inoculación estéril se tomó una muestra de cada uno de los aislados de *E. coli* criopreservados en el banco de cepas.



- Se suspendió las bacterias en 5 ml de TSB en un tubo de ensayo y se incubó a 37°C durante 24 horas (overnight- O/N).
- Con una micropipeta se tomó 0.2 ml del O/N de la bacteria, y se colocó en un tubo de ensayo con 5 ml de TSB.
- Se incubó a 37°C durante 3 horas, hasta observar la turbidez en una densidad óptica de 0.5 de la escala de Mc. Farland (Da Silva, 2019).

3.7. Almacenamiento de colonias bacterianas.

3.7.1 Materiales físicos

Tubos Eppendorf

Probeta

Micropipeta

Puntas para micropipeta

3.7.2 Materiales químicos

Glicerol

3.7.3 Material biológico

Muestras bacterianas

3.7.4 Procedimiento

Las colonias bacterianas que fueron sospechosas se conservaron a través de criopreservación a -20°C. Previamente se inoculó e incubó, como se menciona anteriormente, luego se añadió glicerol hasta lograr una concentración del 30%, el cual, se adicionó 700 µl del cultivo, más 300 µl de glicerol, finalmente se colocó y rotuló en tubos crioviales de 1,5 mL por stock (García & Mario, 2019; Ochoa & Sánchez, 2017).



3.8. Extracción de DNA bacteriano (método de choque térmico).

3.8.1 Materiales físicos

Hisopo.

Pipeta.

Micropipeta.

Punta para micropipeta.

3.8.2 Materiales químicos

TSB.

Agua destilada libre de nucleasas.

3.8.3 Material biológico.

Muestras criopreservadas.

3.8.4 Equipos.

Minicentrífuga.

Incubadora.

Baño María.

Refrigeradora.

3.8.5 Procedimiento

Se reactivaron las muestras criopreservadas del banco de microorganismos, utilizando un hisopado y se inculó en un tubo de ensayo con 5 ml de TSB, posteriormente se incubaron a



37°C durante 12-16 horas (Over/Night (O/N)); al día siguiente, se tomaron 0.5 ml del (O/N), posterior a esto se centrifugaron en la microcentrífuga marca MiniSpin, rotor F-45-12-11, radio 6 cm, fabricante eppendorf a 672 fuerza relativa centrífuga (RCF) durante 3 minutos; el sobrenadante se descartó y la pastilla se resuspendió en agua destilada libre de nucleasas (estéril); se recolectó el sobrenadante superficial, y se calentó mediante baño María a 100°C durante 10 minutos y se enfrió a -20°C por 10 minutos. El sobrenadante sirvió como muestra de DNA que posteriormente fue analizado mediante PCR (García & Miranda, 2018; Suárez & Yañez, 2018).

3.9. Electroforesis en gel de agarosa.

3.9.1. Materiales físicos

Cinta adhesiva

Micropipeta

Puntas para micropipeta

Peinetas para la cubeta de electroforesis

3.9.2 Materiales químicos (Reactivos de laboratorio)

TBE

Gel de agarosa

3.9.3 Materiales biológicos

ADN Bacteriano



3.9.4 Equipos.

Microondas

Refrigeradora

Cubeta de electroforesis

3.9.5 Reactivos para PCR

Los reactivos utilizados se encuentran en la tabla 2

3.9.6 Procedimiento

- Se fundió la solución de agarosa (1% TBE IX) en el microondas durante 2 minutos (70 mL).
- Se dejó enfriar la solución hasta que alcance 50°C.
- Se selló con cinta adhesiva la placa en donde se colocó el gel de agarosa.
- Una vez que se alcanzó los 50°C, se añadió 7 µl de SYBER® Safe DNA Gel Stain, y posteriormente se homogenizó.
- Se vertió la solución de agarosa con SYBER® Safe DNA Gel Stain, en el soporte sellado anteriormente. Posteriormente se colocaron los peines, que sirvieron para formar los pocillos del gel, y se dejó gelificar durante 15 minutos.
- Se retiró la cinta adhesiva con la que se selló anteriormente el soporte del gel y se colocó en la cubeta de electroforesis. Los pocillos debían estar cerca del cátodo (polo negativo, color negro).
- Se añadió TBE 1X hasta que cubrió bien el gel de agarosa.
- Se agregó 3 µl de marcador de peso molecular (Lader) en el primer pocillo.
- Posteriormente, se añadió 10 µl de las reacciones de PCR preparados anteriormente en los siguientes pocillos, hasta completarlos todos.



- Se tapó la cubeta de electroforesis y se procedió a conectar los electrodos a la fuente de alimentación.
- Se programó la fuente a 120 voltios, 400 mAh y se dejó correr la electroforesis durante 60 minutos (Salgado, 2016).

3.10. Amplificación de genes de resistencia mediante PCR.

En la identificación de los genes de resistencia se utilizaron varias cepas control, tal como se detallan a continuación:

Tabla 1. Cepas control utilizadas en la amplificación de los genes de resistencia.

Control (Tipo de gen)	Bacteria
	<i>E. coli</i> DH5 α + pGEM Universitat de Barcelona-MARS
	<i>E. coli</i> DH5 α + pGEM Universitat de Barcelona-MARS
<i>tetA</i>	<i>E. coli</i> DH5 α + pGEM (<i>tetA</i>) Universitat de Barcelona-MARS
<i>sulI</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> INSPI*
	<i>E. coli</i> DH5 α + pGEM Universidad de Barcelona-MARS
	<i>E. coli</i> DH5 α + pGEM Universidad de Barcelona-MARS
QnRA	<i>E. coli</i> DH5 α + pGEM (QnRA)



 Universidad de Barcelona-MARS

QnRS*E. coli* DH5 α + pGEM (QnRS)

Universidad de Barcelona-MARS

INSPI: Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública.
Fuente:(Sánchez, 2018)

Los primeros para la amplificación de genes de virulencia que se utilizaron en este estudio se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 2. Primera para amplificación de genes que codifican factores de virulencia utilizados en este estudio.

Nombre	Secuencia 5'-3' Primer	Tamaño del producto PCR	Referencia
(GTG)⁵	GTGGTGGTGGTGGTG		
<i>stx1-F</i>	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	180 pb	(Seni, 2017)
<i>stx1-R</i>	AGAACGCCCCACTGAGATCATC		
<i>stx2-F</i>	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	255 pb	(Seni, 2017)
<i>stx2-R</i>	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG		
<i>eaeAF</i>	GACCCGGCACAAGCATAAGC	384 pb	(Seni, 2017)
<i>eaeAR</i>	CCACCTGCAGCAACAAGAGG		
<i>hlyAF</i>	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	534 pb	(Seni, 2017)
<i>hlyAR</i>	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT		



O157F	CGGACATCCATGTGATATGG	259 pb	(Seni, 2017)
O157R	TTGCCTATGTACAGCTAATCC		

O111F	TAGAGAAATTATCAAGTTAGTTCC	829 pb	(Acuña et al.,
O111R	ATAGTTATGAACATCTTGTTTAGC		2019)

TEM-F	CTCACCCAGAAACGCTGGTG	503 pb	(Galván et al.,
TEM-R	ATCCGCCTCCATCCAGTCTA		2016)

CTXM-F	ATGTGCAGYACCAGTAARGT	544 pb	(Galván et al.,
CTXM-R	TGGGTRAARTARGTSACCAGA		2016)

3.11. Visualización de las amplificaciones.

- Una vez que se terminó la electroforesis, se visualizaron los fragmentos de DNA mediante luz ultravioleta y se realizó una fotografía de la imagen (Caldes, 2018)

3.12. Transferencia por conjugación:

3.12.1 Materiales físicos

Asa de siembra.

Tubos de ensayo.

3.12.2 Materiales químicos (Reactivos de laboratorio)

Agar Mc. Conkey.

LB.

Agar Mueller-Hinton+Ázida y Cefotixina.

Agar Mueller-Hinton+Ázida.



3.12.3 Materiales biológicos

E. coli J53.

Bacterias STEC positivas.

Transconjugados.

3.12.4 Equipos

Incubadora.

Escala de Mc. Farland.

3.12.5 Procedimiento

- Los factores determinantes de resistencia BLEE de las cepas de *E. coli* O157:H7 se transfirieron utilizando *E. coli* J53 resistente al Azida como cepa receptora.
- Se sembró en Agar Mc. Conkey *E. coli* J53 y las bacterias que STEC positivas las cuales se encontraban criopreservadas.
- Se colocó en caldo LB las colonias tanto de la bacteria donadora como receptora.
- Se incubaron a 37°C O/N durante 3 horas, hasta observar la turbidez en una densidad óptica de 0.5 de la escala de Mc. Farland.
- Se colocó en un tubo de ensayo 4 ml de la bacteria donadora y 4 ml de las bacterias STEC positivas.
- Se incubó a 37°C por 18 horas.
- Se resembró en agar Mueller-Hinton que contendrá Ázida 100 mg/ml y Cefotixina 20 mg/ml.
- Se sembró cada bacteria en agar Mueller-Hinton+Ázida para descartar la transconjugación de genes.
- Se criopreservó las bacterias.



- Se evaluó el fenotipo de las células obtenidas por transconjugación y se verificó a través de antibiogramas con la colocación de discos de antibióticos para BLEE y AmpC evaluando así los perfiles de resistencia (Millan et al., 2012).

3.13. Colocación de los discos de antibióticos.

3.13.1 Materiales físicos

Pinza Anatómica

Cajas Petri

3.13.2 Materiales químicos (Reactivos de laboratorio)

Discos de antibióticos

Agar Mueller-Hinton+Ázida

3.13.3 Equipos

Incubadora

3.13.3 Procedimiento

- Se colocó los discos del panel de antibióticos a evaluar sobre la superficie del agar, utilizando pinzas anatómicas estériles.
- Se aplicó una ligera presión para fijar el disco sobre la superficie del agar, a una distancia recomendada de más de 15 mm del borde de la placa, y de más de 30 mm entre discos, con la finalidad de no solapar los diámetros de difusión del antibiótico, y por ende de los halos de inhibición (Figura 3).
- Posterior a la colocación de discos, las cajas Petri se incubaron a 37°C durante 24 horas.

- Las placas se colocaron en la incubadora en forma invertida para que el agua condensada no caiga sobre el agar; precautelando un cambio indeseado en las condiciones del medio y en la lectura de los halos (Sánchez, 2019).

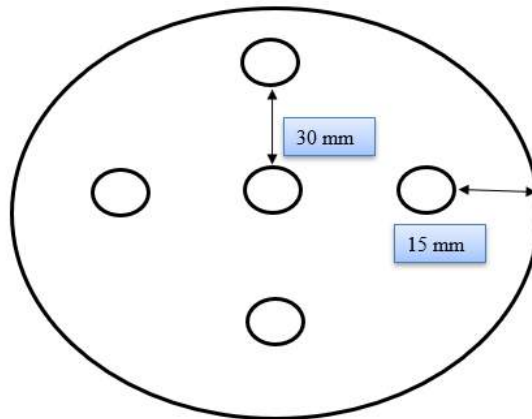


Figura 3: Colocación de discos antibióticos

3.10. Panel de antibióticos utilizado.

Tabla 3. Panel de antibióticos.

Amikacina (AK30)	Amoxicilina/Ac. Clavulánico (AMC30)
Gentamicina (CN10)	Ampicilina/Sulbactam (SAM20)
Piperacilina/Tazobactam (TZP110)	Meropenem (MEM10)
Aztreonam (ATM30)	Imipenem (IMP10)
Cefepime (CEP30)	Ceftriaxona (CRO30)
Ceftazidina (CAZ30)	Cefotaxima (CTK30)
Cefoxitin (FOX30)	Ciprofloxacina (CIP5)
Ac. Nalidíxico (NA30)	Eritromicina (E15)
Colistina (CT10)	Sulfametoxazol/Trimetropin (SXT25)
Vancomicina (VA30)	Ampicilina (AMP30)
Enrofloxacin (ENR5)	

Fuente: (Autor, 2021)

**Tabla 4.** Antibióticos seleccionados para BLEE

Antibiótico	Abreviatura	Sensible (mm)	Intermedio (mm)	Resistente (mm)
Amoxicilina/Ac.	AMC30	>18	14-17	<13
Clavulánico				
Cefepime	FEP30	>25	19-24	<18
Ceftazidina	CAZ30	>21	18-20	<17

Fuente: (CLSI, 2020).

Tabla 5. Antibióticos seleccionados para AmpC

Antibiótico	Abreviatura	Sensible (mm)	Intermedio (mm)	Resistente (mm)
Piperacilina/ Tazobactam	TZP110	>21	18-20	<17
Imipenem	IMP10	>23	20-22	<19
Ceftazidina	CAZ30	>21	18-20	<17

Fuente: (CLSI, 2020).

3.11. Caracterización de bacterias con fenotipo BLEE y AmpC.

3.11.1. BLEE.

Este se confirmó con la prueba de sinergia de doble disco (test confirmatorio de BLEE - CLSI) utilizando Ceftazidina más Acido clavulánico (CAZAMC) – Cefepime (FEP) y Ceftriaxona más Acido clavulánico (CROAMC) . El resultado positivo se interpretó por un aumento mayor o igual a 5 mm en el halo de la cefalosporina en combinación con el



ácido clavulánico (Galván et al., 2016).

3.11.2. AmpC.

Se realizó el tamizaje para β -lactamasas tipo AmpC, empleando el método modificado de Martínez, utilizando discos de Imipenem (IPM)(10 μ g) como antibiótico inductor, suplementados con 20 μ L de una solución de Acido fenilborónico (AFB) (Aldrich®, USA), considerado inhibidor competitivo reversible de las β -lactamasas AmpC; la medida del halo generado por este disco fue comparado con el halo de inhibición del disco de IPM sin el suplemento, una diferencia mayor o igual a 3mm entre los halos de inhibición, fue indicador de la presencia de una β -lactamasa tipo AmpC (Galván et al., 2016)

3.12. Variables:

3.12.1 Variable independiente:

Origen de las cepas de *E. coli* procedentes de caninos.

3.12.2 Variable dependiente:

Presencia o ausencia de serogrupos y genes de virulencia: O157, O111, *stx1*, *stx2*, *eaeA*, *hlyA* sus perfiles fenotípicos de resistencia a antibióticos: BLEE (Amoxicilina/Ácido clavulánico, Ceftazidime, Ceftriaxona, Cefepime), AmpC (Piperacilina/Tazobactam, Imipenem) y los genes de resistencia a antibióticos: *bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *sull*, *tetA*, *QnRA*, *QnRS*.

3.13. Diseño de investigación:



Al realizar una evaluación descriptiva de los perfiles de resistencia de un banco de microorganismos definido, se aplicó una estadística descriptiva (Berrazeg et al., 2013).

3.14. VARIABLES RESPUESTA.

3.14.1 Siembra en Placas con Agar Mueller-Hinton. (MH)

3.14.1.1 Materiales físicos

Marcador

Hisopo estéril

Cajas Petri con MH

Regla para medir halos de inhibición

3.14.1.2 Materiales biológicos

STEC positivos

Transconjugados

E.coli J53

3.14.1.3 Equipos

Cabina de Bioseguridad II

3.14.1.3 Procedimiento

- Se etiquetó apropiadamente cada placa de agar MH (Referencia de: Aislado, número de placa, fecha) para cada organismo analizado.
- Se sumergió un hisopo estéril en el tubo de inóculo.



- Se giró el hisopo contra el costado del tubo, ejerciendo presión firme contra las paredes internas del tubo con la finalidad el exceso de líquido.
- Se inoculó la superficie seca de una placa de agar MH, inoculando con el hisopo tres veces sobre toda la superficie del agar; se procuró girar la placa de manera continua para asegurar una mejor distribución del inóculo.
- Se bordeó la placa con el hisopo para recoger el exceso de líquido, y se desechó el hisopo en un contenedor para desechos biopeligrosos clase II.
- Dentro de la cabina de bioseguridad II, la placa se dejó con su tapa entreabierta, permitiendo que la placa se asiente a temperatura ambiente durante 5 a 15 minutos, favoreciendo que la superficie de la placa de agar se seque previo a la incubación (Racines, 2016).

3.15.1. Medición y lectura de halos de inhibición del antibiograma.

- Después de la incubación, con una regla se midió los tamaños de zona de los halos de inhibición que se formaron.
- A la medición de los diámetros de zona del halo de inhibición, siempre que sea necesario se redondeó hasta el próximo milímetro.
- Se registró el tamaño de la zona en una hoja de registro, descrito en la tabla 4 (Centurion, 2017; Medrano, 2019).

3.15.2. Interpretación de resultados del antibiograma.

Los resultados de sensibilidad se clasificaron en las tres categorías según las tablas del CLSI: sensible (S), intermedio (I) o resistente (R) (CLSI, 2020).



CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio se detectó y caracterizó mediante 2 procedimientos: fenotípica y molecular a aislados de *E.coli*. Los resultados están dados en 2 secciones, primero a partir de las 122 muestras se identificó la presencia de *E. coli* O157:H7 y los genes de virulencia mediante PCR, segundo a partir de las muestras positivas de *E. coli* O157:H7 se evaluó el potencial de transconjugación con las muestras positivas, sus transconjugados y *E. coli* J53 mediante PCR y mediante cultivos se detectó los perfiles de resistencia a antibióticos.

4.1 Identificar la presencia de *E. coli* de serotipo O157:H7

Las 122 muestras (Anexo 12) se sometieron a PCR y los resultados se muestran en la Tabla 7

Tabla 6. Aislados de *Esherichia coli* positivos al serotipo O157:H7.

Serotipo	Estadística	Tamaño de muestra	Positivos	% Positivos
O157:H7	Descriptiva	122	4	3.28

Fuente: (Autor, 2021)

A partir de las 122 bacterias positivas para *E. coli*, 4 (3.28%) fueron positivas para el serotipo O157:H7 ya que la presencia del serotipo es poco común en caninos de nuestro país y la muestra en sí no es tan amplia, el resultado es inferior en comparacion a otras investigaciones como los reportados por (Mustafa et al., 2016) quien encontró de 104 muestras de *E. coli* “18 positivas para O157:H7, de 16 animales diarreicos 11 fueron positivos, 8 positivos en el caso de cachorros y 3 de adultos; mientras tanto de 88 animales no diarreicos 7 reportaron positivos” y (Abdulrazzaq et al., 2021) quienes mencionan que de “72 muestras 7 fueron positivas para O157:H7. Por otro lado, diferentes publicaciones realizadas por (Amadi et al., 2019; Vásquez, 2019) mencionan que ningún aislamiento fue positivo para O157:H7 confirmando que en la actualidad los perros no son reservorios de este serotipo, afirmando que la alimentación en los animales estudiados (caninos y felinos) resultó



principalmente con alimentos balanceados pudiéndose considerar esta circunstancia como uno de los factores determinantes para que no se haya identificado el microorganismo buscado en las muestras ya que el consumo de alimentos contaminados, como por ejemplo carne molida, productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, constituyen una de las principales fuentes de infección para este microorganismo.

Identificación de los genes shigatoxigénicos (*stx1*, *stx2*), genes intimina (*eae*), gen de secreción de la α -hemolisina (*hlyA*) mediante PCR.

Tabla 7. Aislados de *E. coli* positivos para los diferentes genes.

Genes	Nº muestras	Nºmuestras positivas	% muestras positivas
<i>eaeA</i>	122	7	5.74
<i>hlyA</i>	122	2	0.82
<i>stx1</i>	122	0	0
<i>stx2</i>	122	0	0

Fuente: (Autor, 2021)

Ninguno de los 122 aislados fueron positivos por PCR para los genes (*stx1*, *stx2*) los cuales se encargan de la inhibición de síntesis de proteínas dentro de las células del hospedero y en última instancia la muerte de la misma (Melebari, 2019) este resultado pudo haber sido influenciado al tamaño de muestra y la incidencia de la enfermedad en la región (Vásquez, 2019; Zotta et al., 2015) . Mientras que el 5.74% (7/122) de los aislados fueron positivos para *eaeA* causando en el hospedero adherencia íntima de las bacterias a los enterocitos y destrucción de microvellosidades (Oderiz et al., 2018) y por otro lado el 0.82% (2/122) para *hlyA* las cuales atacan las membranas de las células sanguíneas provocando así la ruptura celular (Melebari, 2019) estos resultados se dieron debido a que como se muestra en el (Anexo 12) las muestras provenían de perros sanos y enfermos (Distemper, Traquebronquitis, Gastroenteritis, Neoplasias, Dermatitis, Osteoartritis, Raquitismo, Problemas de piel, Intususcepción, Parvovirus) haciendo constancia que las muestras positivas pertenecían: 2 genes a perros sanos y 7



genes a perros enfermos (Gastroenteritis por Parvovirus) es decir que se puede tener perros que sin tener signología alguna pueden albergar estos genes de virulencia que en el último de los casos puede provocar la muerte. El principal factor de fuente de infección es la cultura de nuestra sociedad ya que en nuestro país la mayoría de las personas están suministrando a sus mascotas dietas barf cruda o mixta donde se podría tener el origen de la infección como se muestra en el (Anexo 12) además que en la mayoría de los hogares los dueños de mascotas les suelen dar como premio o snack leche mezclada con las croquetas. En el estudio realizado por (Bedasa et al., 2018) confirma lo antes mencionado al reportar que “en 200 muestras examinadas el mayor asilamiento de *E.coli* O157:H7 fue en la leche cruda 12%, seguido por queso 5.71% y carne 3.07%”. En los peores escenarios existen hogares que se encuentran cerca de un camal o de una curtiembre siendo el lugar idóneo donde se puede dar otro tipo de transmisión confirmando que las 2 formas de transmisión son alimentarias es así como (Bergaglio, 2020) indica que la principal fuente de transmisión a los seres humanos es por medio del consumo de alimentos contaminados y el contacto con animales de compañía se han considerado modos emergentes de transmisión.

Identificación de genes de resistencia y virulencia a partir de las muestras positivas *E. coli* O157: H7 y sus transconjugados.

Se evaluó el potencial de transconjugación utilizando *E. coli* J53 resistente al azida como cepa receptora.

Tabla 8. Genes de resistencia y virulencia.

Gen	N° <i>E. coli</i> transconjugantes analizadas	N° positivos	% positivos por Gen
<i>bla_{TEM}</i>	9	7	77.77
<i>bla_{CTX-M}</i>	9	8	88.88
<i>eaeA</i>	9	8	88.88
<i>hlyA</i>	9	4	44.44
tet A	9	2	22.22
<i>bla_{SHV}</i>	9	0	0
<i>sulI</i>	9	0	0
<i>QnRA/QnRS</i>	9	0	0
<i>bla_{CMY}</i>	9	0	0

Fuente: (Autor, 2021)



A partir de los aislados positivos *E. coli* O157:H7 con sus respectivos transconjugados y la bacteria J53, se obtuvo que de los 9 aislados para los genes de resistencia *bla_{SHV}* la cual es una enzima capaz de hidrolizar Cefalosporinas de amplio espectro (Gundran et al., 2019), *sul 1* quien se encarga de codificar formas mutantes de la enzima blanco (Sulfametoxazol) (Rhouma et al., 2020), *QnRA/QnRS* son genes los cuales a través del plásmido median la resistencia a Quinolonas (Basantes, 2017) y *bla_{CMY}* al pertenecer al grupo de betalactamasas se caracterizan por hidrolizar el enlace amida del núcleo betaláctamico, inactivando de esta manera el antibiótico (Gundran et al., 2019) resultaron negativos debido a que en la práctica clínica estos medicamentos son usados como última opción o a su vez se respeta el tiempo terapéutico; resultados similares los obtuvo (Ruiz et al., 2020) quien no encontró la presencia de ningún gen de resistencia de los que evaluaron *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}* debido a que en su estudio el tamaño de la población fue muy reducido. Por otro lado para el gen *bla_{TEM}* con un porcentaje de 77.77% (7/9) positivos se confirmó que en nuestro país el uso correcto de una terapéutica ética es la principal desventaja a la hora de tratar enfermedades o la irresponsabilidad de los propietarios de mascotas quienes no terminan el tratamiento o alargan el tiempo del mismo favoreciendo así la presencia de este gen tanto en perros enfermos como en perros sanos (Tabla 10), resultados similares los obtuvieron (Marcos-Carbajal et al., 2020) quienes identificaron en su estudio el gen *bla_{TEM}* en un 31.4% y el gen *bla_{CTX-M}* en un 18.6% indicando que puede haber una posible influencia de factores externos ante la presentación de la resistencia bacteriana es decir que fueron tratados en algún momento de su vida con betalactámicos lo cual confirma lo expuesto por (Herrera et al., 2019) quien menciona que la producción de β -lactamasas es el principal mecanismo de resistencia en enterobacterias y la mayoría de enzimas responsables pertenecen a las familias *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}* quien mostró un resultado alto en la presente investigación reafirmando lo que menciona el autor. En el caso de *bla_{CTX-M}* y *eaeA* se obtuvieron resultados positivos en la mayoría de las muestras 88.88% (8/9) confirmando lo antes expuesto en el caso de *bla_{CTX-M}*, además en el caso del gen *eaeA* (Navarro et al., 2017) menciona que este gen se encuentra presente en las cepas de los serotipos más virulentos como O157:H7,



O26:H11 afirmando así nuestros resultados en la (Tabla 10) donde se encuentran los aislados positivos de *E. coli* O157:H7; respecto a resultados obtenidos, en la investigación realizada por (Sarmiento et al., 2013) menciona que el gen *eaeA* se encontró en 12 de 68 (17.6%) aislados de perros con diarrea, y 5 de 76 (6.6%) de perros sin diarrea demostrando así que un mayor número de aislados de perros presentan dicho gen. Finalmente, el 22.22% (2/9) resultó positivo para *tet A* siendo el responsable de provocar resistencia a la Tetraciclina la cual a menudo se transmite por elementos genéticos movilizables, como plásmidos o móviles como transposones, los plásmidos que albergan genes de resistencia a la Tetraciclina también pueden portar otros genes de resistencia a antibióticos (Sun et al., 2019) es por esa razón que en el presente estudio obtuvimos resultados positivos de distintos genes de resistencia por el tipo de transmisión que algunos genes poseen. Por otro lado en la mayoría de los casos la Tetraciclina se usa indiscriminadamente a nivel veterinario llegando a causar así resistencia; por lo tanto, pese a que solo en 2 casos se dió la presencia de este gen, cabe mencionar que las muestras provenían de perros sanos confirmando de esta manera lo investigado por (Jiménez et al., 2017) quien expone en su investigación que no fue infrecuente la resistencia a la Tetraciclina mencionando que los niños estaban sanos y que ningún niño fue medicado con anterioridad, confirmando que las cepas resistentes parecieron persistir bien en la microbiota, por lo que concluye en su estudio que en algunos casos los bebés albergaban una *E. coli* resistente a la tetraciclina.

Presencia de genes resistencia a partir de aislados positivos O157:H7 , transconjugados y *E. coli* J53 mediante PCR.

Tabla 9. Presencia de genes de resistencia y virulencia identificados mediante PCR.

Genes de resistencia	J53	TR1	TR2	TR3	TR4	CVSP17Sa	CVSP17Sb	CVSP18Ea	CVSP15Sa
<i>bla_{TEM}</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>bla_{CTX-M}</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>bla_{SHV}</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>eaeA</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>hlyA</i>	-	-	-	+	+	-	-	+	+



<i>sul I</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>tet A</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>QnRA/ QnRS</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>bla_{CMY}</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fuente: (Autor, 2021).

Detección de los perfiles de resistencia a antibióticos evaluados a través de antibiograma

Tabla 10. Número de cepas de *E.coli* O157:H7 resistente al panel de antibióticos.

Antibiótico	N° Resistente	%	N° Intermediario	%	N° Sensible	%	Total muestras	TOTAL %
Gentamicina					9	100	9	100
Aztreonam			8	88.8 8	1	11.1 1	9	100
Cefotaxime	5	55.5 5	4	44.4 4			9	100
Cefoxitin					9	100	9	100
Ciprofloxacina	2	22.2 2	6	66.6 6	1	11.1 1	9	100
Meropenem					9	100	9	100
Amikacina			1	11.1 1	8	88.8 8	9	100
Colistina			8	88.8 8	1	11.1 1	9	100
Enrofloxacin	3	33.3 3	1	11.1 1	5	55.5 5	9	100
Ac Nalidixico	1	11.1 1	3	11.1 1	5	55.5 5	9	100
Sulfametoxazol/Trimetropin	4	44.4 4			5	55.5 5	9	100
Eritromicina	8	88.8			1	11.1	9	100



		8				1		
Ampicilina/sulbactam			8	88.8	1	11.1	9	100
				8		1		
Ampicilina	8	88.8			1	11.1	9	100
		8				1		
Vancomicina	8	88.8			1	11.1	9	100
		8				1		

Fuente: (Autor, 2021)

Los aislamientos de *E. coli* O157:H7 positivos, sus transconjugados y bacteria *E. coli* J53 fueron evaluados para 15 antibióticos, donde se detectó en la mayoría de casos un 88.88% de resistencia a Eritromicina, Vancomicina y Ampicilina esto es debido al uso indiscriminado de antibióticos sin realizar un previo antibiograma debido a que los propietarios de los perros no suelen aceptar el costo adicional o la venta libre en almacenes agropecuarios a todo tipo de personas sin licencia profesional; resultados iguales a los de la investigación lo obtuvieron (López-Velandia et al., 2015) quienes evaluaron: Cefotaxima (55.55%), Ciprofloxacina (22.22%), Enrofloxacin (33.33%), Ac. Nalidíxico (11.11%), Sulfametoxazol/Trimetropin (44.44%), Eritromicina, Ampicilina y Vancomicina (88.88%) mencionando que la resistencia a los antibióticos probados puede atribuirse al uso indiscriminado, empírico de medicamentos, necesitando como factor primordial un diagnóstico de laboratorio previo (antibiograma). Por otro lado para Cefotaxime el 55.55% (5/9) de las muestras son resistentes, el resultado presente es porque este medicamento es usado como un antibiótico de amplio espectro en la práctica diaria de algunos profesionales; resultados cercanos a los expuestos por (Cuevas, 2020) quien en su investigación demostró que de un total de 34 cepas *E. coli* identificadas el 94% es resistente a cefotaxime destacando que las cepas aisladas de perro presentan con mayor frecuencia resistencia que la de humanos debido a la exposición a fármacos que tienen a través de su alimentación, hábitos, convivencia; así como también el uso indiscriminado de fármacos por parte de sus dueños. Sin embargo, se encontró que en los 9 aislados, la Gentamicina, Cefoxitin y Meropenem reflejaron sensibilidad a dichos antibióticos y Amikacina. Por lo tanto, la emergencia de enterobacterias resistentes



a la gran variedad de antimicrobianos de importancia clínica es una realidad de interés a nivel mundial es por eso que se sugiere identificar la resistencia a antibióticos antes de prescribir un tratamiento. Esto se obtiene a través de cultivos y antibiogramas.

Identificación de bacterias con fenotipo BLEE.

Tabla 11. Aislados de *E. coli* O157:H7 positivos para los diferentes genes.

Muestra	Origen	BLEE	AmpC	Resistencia a azida
CVSP17Sa	CVSP	+	+	
CVSP17Sb	CVSP	+	+	
CVSP18Ea	CVSP	+	+	
CVSP15Sa	CVSP	+	+	
J53	Laboratorio	-	-	+
TR1	CVSP17Sa+ <i>E. coli</i> J53	+	+	+
TR2	CVSP17Sb+ <i>E. coli</i> J53	+	+	+
TR3	CVSP18Ea+ <i>E. coli</i> J53	+	+	+
TR4	CVSP15Sa+ <i>E. coli</i> J53	+	+	+

TR*: (Transconjugado *E. coli* J53+ cada bacteria) , CVSP*: (Clínica Veterinaria Santa Prisca)

Fuente: (Autor, 2021).

Para determinar si las bacterias son BLEE y AmpC se procedió a realizar ensayos de transconjugación a partir de los 4 positivos del serotipo O157:H7 donde se tenía una bacteria receptora (*E. coli* J53) y donadora (cada muestra positiva) con sus respectivos transconjugados obteniendo como resultado el 88%. Resultados similares con respecto a BLEE los obtuvo (Muzo, 2017) quien de 30 muestras provenientes de pollos broiler, obtuvo 24 positivas para BLEE es decir el 80%, mientras que el 20% (6/30) obtuvo el fenotipo AmpC concluyendo que existe una presión selectiva para el apareamiento de cepas resistentes a los antibióticos, dado el control deficiente y



uso indiscriminado de los mismos. Por otro lado (Centeno et al., 2018) evaluó 50 muestras procedentes del laboratorio de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos encontrando valores diferentes a los nuestros, en el caso de BLEE sólo el 2% presentó el fenotipo mencionando que la presencia del mismo compromete la eficacia de tratamiento con cefalosporinas de 3^{ra} generación y en el caso de AmpC de la misma manera encontró el 2% afirmando que pese a que el resultado sea bajo es alarmante encontrar este tipo de fenotipos ya que ocasionan fracasos terapéuticos. Con respecto a la evaluación de ázida de sodio se encontró en la investigación los transconjugados y *E. coli* J53 positivos a BLEE Y AmpC concluyendo que hubo una transferencia de genes de resistencia confirmando que estos genes se encuentran codificados dentro de plásmidos. El hallazgo de la información genética que codifica para esta enzima tiene importancia clínica importante más aun cuando se han encontrado mecanismos de resistencia asociados, por esas razones, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) promueven el monitoreo de microorganismos multidrogoresistentes siendo de importancia *E. coli*.



CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones.

De los 122 aislados, 4 muestras dieron positivo para *E. coli* O157:H7 de las cuales 3 provenían de perros sanos y sólo 1 de perro enfermo por lo que cabe señalar que dicho serotipo puede estar presente en perros sin signología o aparentemente sanos pudiendo causar una grave zoonosis.

Al evaluar los genes de virulencia, 7 muestras poseían el gen *eaeA* y *hlyA* los cuales a nivel interno del organismo causan destrucción en las microvellosidades y células endoteliales. De la misma manera, al evaluar la presencia de los genes de virulencia de las cepas positivas O157:H7, se detectó la presencia de *eaeA* y *hlyA* en muestras de perros sanos y enfermos.

La presencia de genes de resistencia en el caso de *bla_{TEM}* (7/9) y *bla_{CTXM}* (8/9) en las muestras positivas a O157:H7 y sus transconjugados, sugiere uso indiscriminado de β -láctamicos lo que promueve al uso de antibióticos de mayor acción, pero también que podrían causar mayor resistencia. En el caso de *tetA* (2/9) su uso hoy en día es muy limitado ya que es una familia de medicamentos que no se prescribe demasiado debido al gran número de efectos secundarios que provoca. La presencia de microorganismos resistentes es preocupante ya que el principal factor son los dueños de las mascotas porque la mayoría automedican antes de llegar donde el profesional por lo que se tendría que culturalizar más a la población acerca de la manera correcta de proceder frente a un perro enfermo



La identificación de perfiles fenotípicos BLEE y AmpC al encontrarse el 100% de positivos a O157:H7 y sus transconjugados es alarmante al considerar que las mascotas pueden representar un reservorio silencioso de estos patógenos, confirmando que estos genes se encuentran codificados dentro de plásmidos.

La evaluación de los perfiles de resistencia y sensibilidad antibiótica en los 9 aislados de *E. coli* STEC, transconjugados y *E. coli* J53 mostraron resistencia en un 88.88% a Eritromicina, Vancomicina y Ampicilina; sensibilidad frente a Gentamicina, Cefoxitin y Meropenem, sugierendo que los animales de compañía pueden representar potenciales reservorios de microorganismos resistentes por lo que se pone en evidencia la necesidad de realizar antibiogramas y cultivos antes de prescribir un tratamiento.

6.2 Recomendaciones.

Realizar la identificación de otros serotipos que puedan causar zoonosis o agravar el cuadro clínico en perros.

Identificar la presencia de STEC en muestras provenientes de seres humanos asociados a la presencia de caninos en su entorno.



CAPÍTULO VII: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- Abad, F. (2018). *Resistencia a antibióticos β -lactámicos y producción de BLEE, en cepas de Escherichia coli multirresistentes, aisladas de mascotas y sus dueños* (Bachelor's thesis).
- Abdulrazzaq, K. M., Oain, M. S., Majeed, H. M., & Al-Hyani, O. H. (2021). Molecular detection of rfbO157, Shiga toxins and hemolysin genes for *Escherichia coli* O157: H7 from canine feces in Tikrit and Mosul cities, Iraq. *Iraq Journ Vet Scien*, 35(2), 325-329.
- Acuña, P., Florentín, M., Rojas, N., Rodríguez, F., & Guillén Rosa. (2019). Estandarización de una técnica de PCR múltiple para la detección de los serogrupos O157, O104 y “big six” de *Escherichia coli* productora de la toxina Shiga (STEC). *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 17(2).
- Aguilar-Zapata, D. (2015). E. coli BLEE, la enterobacteria que ha atravesado barreras. *Médica Sur*, 22(2), 57-63.
- Akhtar, S., Ahmad, B., Haider, I., Muhammad, T., Afzal, S., & Ikram, N. (2018). Frequency and culture sensitivity of febrile neutropenic episodes in pediatric patients of acute lymphoblastic leukemia on chemotherapy. *Journ Rawalp Med Coll*, 22(195-198).
- Amadi, V. A., Hariharan, H., Amadi, O. A., Matthew-Belmar, V., Nicholas-Thomas, R., Perea, M. L., Carter, K., Rennie, E., Kalasi, K., Alhassan, A., Kabuusu, R. M., Alozie, G. U., Fields, P. J., Pinckney, R., & Sharma, R. (2019). Antimicrobial resistance patterns of commensal *Escherichia coli* isolated from feces of non-diarrheic dogs in Grenada, West Indies. *Vet World*, 12(12), 2070-2075.
- Arrieche, A. (2016). *Aplicación del método mejorado de procesamiento de imágenes de Biospeckle a ensayos con trypanosoma cruzi en viales de cultivo profundo* (Doctoral dissertation, Universidad de los Andes- Facultad de Farmacia y Bioanálisis-Escuela de Bioanálisis).
- Bai, X., Fu, S., Zhang, J., Fan, R., Xu, Y., & Sun, H. (2018). Identification and pathogenomic analysis of an *Escherichia coli* strain producing a novel Shiga toxin 2 subtype. *Scien Rep*, 8(1), 1-11.
- Bajaj, P., Singh, N., & Viridi, J. (2016). *Escherichia coli* β -Lactamases: What Really Matters. *Front Microb*, 7, 417.
- Bedasa, S., Shiferaw, D., Abraha, A., & Moges, T. (2018). Occurrence and antimicrobial susceptibility profile of *Escherichia coli* O157:H7 from food of animal origin in Bishoftu town, Central Ethiopia. *Imter Journ Food Contam*, 5(1), 1-8.
- Bergaglio, J. P. (2020). *Vista de Contaminación de alimentos por Escherichia coli y la inocuidad alimentaria como eje fundamental*. INNOVA UNTREF.



- Berrazeg, M., Drissi, M., Medjahed, L., & Rolain, J. M. (2013). Hierarchical clustering as a rapid tool for surveillance of emerging antibiotic-resistance phenotypes in *Klebsiella pneumoniae* strains. *Journ of Med Microb*, 62(6), 864874.
- Bourne, J., Chong, W., & Gordon, D. (2019). Genetic structure, antimicrobial resistance and frequency of human associated *Escherichia coli* sequence types among faecal isolates from healthy dogs and cats living in Canberra, Australia. *PloS One*, 14(3).
- Cabra, E. T., Hernández-Fernández, J., & Rubiano, C. C. P. (2018). Cuantificación de proteínas totales en extractos crudos de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* aisladas de boyacá y cundinamarca. *JDC*, 3(2), 37-43.
- Caldes, C. A. B. (2018). Estandarización de una pcr múltiple para la identificación de tres patógenos en abejas del ecuador (Bachelor's thesis).
- Calero, W. (2016). Evaluación de reservorios ambientales de partículas fágicas portadoras de genes resistencia a antibióticos (Doctoral dissertation, Universitat de Barcelona).
- Calipuy, A., Ortiz, M., Parraguez, M., Solsol, A., & Zambrano, R. (2018). Aislamiento e identificación de bacterias uropatógenas en muestras urinarias de mujeres atendidas en una clínica particular de Lima, Perú. *Rev de Inves Cientif*, 1(1).
- Calvo, J., Cantón, R., Fernández, F., & Mirelis, B. (2011). Procedimientos en microbiología clínica. *Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en Gram negativos*.
- Carreón. (2019). *Estudio molecular de la resistencia y virulencia de cepas de Escherichia coli productoras de β -lactamasas de espectro extendido aisladas de vegetales crudos* (Master's thesis, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).
- Castro, V., Tavares, R., Conte, C., & Souza, E. (2017). Shigatoxin producing *Escherichia coli*: pathogenicity, supershedding, diagnostic methods, occurrence, and foodborne outbreaks. *Compr Rev in Food Scie*, 16, 1269-1280.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2017). *Emerging Drug Resistance*. <https://www.cdc.gov/>
- Centurion, J. (2017). *Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de Laurus nobilis "Laurel" sobre Staphylococcus aureus ATCC 25923* (Bachelor's thesis)
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2013). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-Third Informational Supplement*. <https://clsi.org>
- CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute). (2020). *Methods for antimicrobial broth dilution and disk diffusion susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals*. <https://clsi.org>



- Cundon, C. C., Ameal, A., Maubecín, E., & Bentancor, A. (2018). Caracterización de cepas patógenas extraintestinales de *Escherichia coli* aisladas de perros y gatos de compañía de Buenos Aires, Argentina. *Rev Arg Microb*, 50(3), 290-294.
- Da Silva, S. (2019). *Aislamiento y caracterización de bacterias metanogénicas de sedimentos urbanos del estero el macho mediante un enfoque ecosalud* (Bachelor's thesis, Machala: Universidad Técnica de Machala).
- Egas, P. (2016). *Caracterización fenotípica y genotípica del bacteriófago 5Q18 activo contra Escherichia coli enteropatógena multirresistente* (Bachelor's thesis, PUCE).
- Fehlberg, L. C. C., Nicoletti, A. G., Ramos, A. C., Rodrigues-Costa, F., de Matos, A. P., Girardello, R., Marques, E. A., & Gales, A. C. (2016). *In vitro susceptibility of Burkholderia cepacia complex isolates: Comparison of disk diffusion, Etest®, agar dilution, and broth microdilution methods. Diag Microb Infec Dis*, 86(4), 422-427.
- Galván, F., Agapito, J., Bravo, N., Lagos, J., & Tamariz, J. (2016). Caracterización fenotípica y molecula de *Escherichia coli* productoras de B-Lactamasas de espectro extendido en pacientes ambulatorios de Lima, Perú. *Rev Med Hered*, 22-29.
- García, A., & Miranda, A. (2018). Evaluación de métodos de extracción de ADN bacteriano en muestras fecales de pacientes diagnosticados con infección por *Helicobacter pylori*. *Biociencias*, 7-16.
- García, G., & Mario, C. (2019). *Evaluación de la estabilidad de propiedades de promoción del crecimiento en tres aislamientos nativos de Gluconacetobacter spp., conservados mediante criopreservación* (Bachelor's thesis).
- García-De la Peña, C., Rojas-Domínguez, M., Ramírez-Bautista, A., Vaca-Paniagua, F., Díaz-Velásquez, C., Ávila-Rodríguez, V., Valenzuela-Núñez, L. M., Meza-Herrera, C. A., García-De la Peña, C., Rojas-Domínguez, M., Ramírez-Bautista, A., Vaca-Paniagua, F., Díaz-Velásquez, C., Ávila-Rodríguez, V., Valenzuela-Núñez, L. M., & Meza-Herrera, C. A. (2019). Microbiota bacteriana oral de la tortuga del bolsón *Gopherus flavomarginatus* en la Reserva de la Biosfera Mapimí, México. *Rev mex*, 90.
- Gastelo-Acosta, R. M., Díaz-Sipián, R. S., & Maguiña Vargas, C. (2016). Carbapenemasas en bacterias Gram negativas no fermentadoras aisladas en servicios críticos del Hospital Regional Lambayeque, diciembre 2014 a Julio 2015. *Acta Médica Peruana*, 33(3), 183-188.
- Gonzalez, A., & Cerqueira, A. (2019). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in the animal reservoir and food in Brazil. *JAM*. 128 (6),1568-1582



- Haymaker, J., Sharma, M., Parveen, S., Hashem, F., May, E., Handy, E., White, C., & East, C. (2019). Prevalence of Shiga-toxicogenic and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in untreated surface water and reclaimed water in the Mid-Atlantic U.S. *Env res*, 172, 630-636.
- Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. <https://asm.org/a/ASMScience>
- Joensen, K. G., Tetzschner, A. M. M., Iguchi, A., Aarestrup, F. M., & Scheutz, F. (2015). Rapid and Easy In Silico Serotyping of *Escherichia coli* Isolates by Use of Whole-Genome Sequencing Data. *Jour of Clin Microb*, 53(8), 2410-2426.
- Kalendar, R., Tselykh, T. V., Khassenov, B., & Ramanculov, E. M. (2017). Introduction on using the FastPCR software and the related java web tools for PCR and oligonucleotide assembly and analysis. In *PCR* (pp. 33-64). Springer, New York, NY.
- Liu, X., Liu, H., & Hao, C. (2017). Association between virulence profile and fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in China. *Jour of Infect in Develop Countr*, 11(04), 306-313.
- Luna, S., Vikram, Krishnasamy, L., Saw, & Lori Smith, J., Wagner. (2018). Outbreak of *E. coli* O157:H7 infections associated with exposure to animal manure in a rural community—Arizona and Utah, June–July 2017. *Morb and Mort Week*, 67(23), 659
- Marcos-Carbajal, P., Salvatierra, G., Yareta, J., Pino, J., Vásquez, N., & Díaz, P. (2020). Caracterización microbiológica y molecular de la resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* uropatógenas de hospitales públicos peruanos. *Rev Per*, 38(1), 119-123.
- Medrano, H. (2019). Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de *Citrus aurantifolia* (Limón Peruano) frente a *Staphylococcus aureus*. Universidad Católica de los Ángeles.
- Millan, B., Castro, D., Araque, M., Ghigliione, B., & Gutkind, G. (2012). ISCR1 asociado con genes blaCTX-M-1 y blaCTX-M-2 en plásmidos IncN e IncFIIA aislados en *Klebsiella pneumoniae* de origen nosocomial en Mérida, Venezuela. *Biomédica*, 33(2), 268-275.
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2019). Plan Nacional para la prevención y control de la resistencia antimicrobiana. <https://www.salud.gob.ec>.
- Mohammad, N., Alaboudi, A., Osaili, T., & Mohammad, O. (2016). Resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from layer farms in northern Jordan using microbroth dilution and disc diffusion techniques. *Jour of Food Scie*, 81(7).
- Muhammad, M., Goel, P., Mittal, D., & Maan, S. (2020). Molecular investigations of tetracycline resistance genes in *E. coli* strains from dogs affected with urinary tract infections. *Jour for Vet Sci*, 64(1), 17-25.



- Muñoz, M. (2020). Detección de patógenos entéricos con pcr multiplex en niños menores de cinco años que acudan por diarrea aguda al servicio de urgencias (Bachelor's thesis)
- Murray, Rosenthal, & Pfaller. (2017). *Microbiología médica*. Elsevier Health Sciences.
- Mustafa, H., Afaf, Y., & Mohammed, A. (2016). La detección de los genes virulentos en *E. coli* O157:H7 aislado de cachorros y perros adultos por reacción en cadena de la polimerasa. *Jour of Scie*, 4(1), 1-6.
- Núñez, E. (2018). Determinación de la presencia de genes de resistencia a antibióticos emergentes en aislados de *Escherichia coli* en caninos de la ciudad de Ambato. (Bachelor's thesis).
- Ochoa, J. F., & Sánchez, A. (2017). Caracterización molecular y criopreservación de hongos y bacterias asociados a la rizósfera de especies vegetales acumuladoras de metales pesados en suelos contaminados por minería. *Bionatura*, 2(2), 288-295.
- Oderiz, S., Leotta, G. A., & Galli, L. (2018). Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en niños atendidos en un hospital pediátrico interzonal de la ciudad de La Plata. *Rev Arg de Microb*, 50(4), 341-350.
- OMS (2016). Importancia de la resistencia a los antimicrobianos para la salud pública.
<https://www.un.org/youthenvoy/es/2013/09/oms-organizacion-mundial-de-la-salud/>
- Pardilla, D. (2017). Estudio de protocolos de comunicación bacterianos: conjugación y quorum sensing. (Doctoral dissertation, Informatica).
- Pérez, C. (2017). Fenotipos de resistencia bacteriana en pacientes uropatógenos del Hospital Ventanilla 2018 (Bachelor's thesis).
- Quishpe, J. A. C. (2019). *Efecto inhibitorio del extracto de Origanum vulgare (orégano) en cepas de Staphylococcus aureus. Estudio in vitro* (Bachelor's thesis, Quito: UCE).
- Racines, M. (2016). *Evaluación de la eficacia de una intervención administrativa sobre los procesos de preparación del agar Mueller Hinton en el Hospital General de las Fuerzas Armadas del Ecuador y en el Hospital Pablo Arturo Suárez* (Master's thesis, Quito: UCE).
- Redondo, M. G. (2016). *Control de la conjugación bacteriana: = Control of bacterial conjugation* (Doctoral dissertation, Universidad de Cantabria).
- Retamal, F. I. F. (2018). Detección de *Escherichia coli* O157:H7 y *Campylobacter jejuni* en canales de bovinos en faenadoras de la region del Bio Bio (Bachelor's thesis)
- Rípodas Navarro, A., Fernández Moreira, D., Macho Martínez, M., Rípodas Navarro, A., Fernández Moreira, D., & Macho Martínez, M. (2017). Investigación de *Escherichia coli* productor de toxinas shiga (STEC) en carnes y derivados cárnicos. *San Mil*, 73(3), 147-152.



- Robalino, D. (2020). *Perfiles fenotípicos de resistencia a antibióticos en aislados de Escherichia coli de origen canino de la ciudad de Ambato*. (Bachelor's thesis).
- Rojas, D. J. R. (2018). Caracterización de *Escherichia coli* productora de toxina shiga aislada desde carne molida en la ciudad de Santiago de Chile (Bachelor's thesis).
- Ruiz, J., Pons, M., Mosquito, S., Ochoa, T., & Sáenz, Y. (2020). Caracterización de *Escherichia coli* D7111 productora de β -lactamasa TEM-176. 5. *Rev Per Med Exp*, 38(1), 130-135.
- Salgado, M. J. F. (2016). Estandarización de la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturante (Dgge) para la tipificación de alelos Drb del Cmh clase II en *Aotus vociferans* (Plathyrrini) (Bachelor's thesis).
- Sánchez, K. (2018). *Perfiles fenotípicos y genotípicos de resistencia a antibióticos en Salmonella de origen aviar aislados en la provincia de Tungurahua y Cotopaxi* (Bachelor's thesis).
- Sánchez, M. (2019). Caracterización fenotípica y genotípicas de bacterias antibiótico resistente aisladas del tubo gastrointestinal de aves Columba livia que circulan por el centro de la ciudad de León; en período de agosto 2016-agosto 2017.
- Sarmiento, J., Medeiros, L., Chiconi, C., Martins, F., Pelayo, J., Rocha, S., Blanco, J., Blanco, M., Zanutto, M., Kobayashi, R., & Nakazato, G. (2013). Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats in Brazil. *Vet microb*, 166(3-4), 676-680.
- Seni, O. (2017). Detección de cepas de *Escherichia coli* Shiga Toxigénica (STEC) y enteropatógena (EPEC) basada en PCR multiplex. *La técnica*, (15), 78-89.
- Suárez, L., & Yañez, L. (2018). Extracción de ADN de bacterias conservadas en el banco de cepas de la Universidad Francisco de Paula Santander sede Campos Elíseos. *Respuestas*, 23(1), 24-28.
- Tanawan, S., Lübke-Becker, A., Hanke, D., Eichhorn, I., Febler, A., & Schwarz, S. (2020). Molecular and phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from ocular surfaces of dogs and cats suffering from ophthalmological diseases, *Vet Microb*, 244, 108687
- Tiffer, M. (2016). Identificación de *Escherichia coli* productora de shiga toxina en producto terminado de Bovinos sacrificados en el matadero Nuevo Carnic S.A, en el período comprendido de febrero a abril del 2016 (Doctoral dissertation).
- Torkan, S., Bahadoranian, M., Khamesipour, F., & Anyanwu, M. (2016). Detection of virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* isolates from diarrhoeic dogs in Iran. *Austr Jour of Vet Scien*, 48(2), 181-190.
- Torres, A. G. (2016). *Escherichia coli* diseases in the Americas a multidisciplinary approach. *Path and dise*, 75(2).



- Universidad de Berkeley, & IGEM. (2006). A standard protocol for describing individual-based and agent-based models. *Ecological Modelling*, 198(1-2), 115-126.
- Valencia Cano, P. A. (2009). Evidencia de transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos provenientes de bacterias ambientales (Bachelor's thesis, Quito: USFQ).
- Valilis, E., Ramsey, A., Sidiq, S., & DuPont, H. L. (2018). Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*—A poorly appreciated enteric pathogen: systematic review. *Inter Jour of Infect Dise*, 76, 82-87.
- Vásquez, V. (2019). Caracterización de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga aislada desde perros y gatos de comunas de la Región Metropolitana (Bachelor's thesis).
- Vega-Manriquez, X. D., Ubiarco-López, A., Verdugo-Rodríguez, A., Hernández-Chiñas, U., Navarro-Ocaña, A., Ahumada-Cota, R. E., Ramírez-Badillo, D., Hernández-Díaz de León, N., & Eslava, C. A. (2020). Pet dogs potential transmitters of pathogenic *Escherichia coli* with resistance to antimicrobials. *Archiv of Microb*, 1-7.
- Velecela, D. (2017). Determinación de la susceptibilidad de *Escherichia coli* en el antibiograma, hacemos constar que luego de haber revisado el manuscrito del precitado trabajo, consideramos que reúne las condiciones académicas para continuar con la fase de evaluación correspondiente (Bachelor's thesis).
- Villagrán Padilla, C. L., & Ruiz Tagle, A. C. (2019). Una mirada hacia el mundo bacteriano (Bachelor's thesis).
- Yi-Yun, L., Yang, W., Walsh, T., Zisen, L., Liu, J.-H., & Gu, D. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *The Lancet infect disea*, 16(2), 161-168.
- Zahraei Salehi, T., Askari Badouei, M., & Mehdizadeh Gohari, I. (2011). Molecular detection and antibacterial susceptibility of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and shigatoxicogenic *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from healthy and diarrhoeic dogs. *Compar Clin Path*, 20(6), 585-589.
- Zotta, C. M., Lavayén, S., Hollmann, P., & Lanfranconi, V. (2015). Animales domésticos como reservorio de *Escherichia coli* Productor de Toxina Shiga en Mar del Plata. *Jour of the Selva Andina Res Soc*, 6(1), 2-9.



VIII: ANEXOS

Anexo 1. Crecimiento bacteriano de cepa positiva *E. coli* O157:H7 con *E. coli* J53





Anexo 2. Crecimiento bacteriano (*E. coli* O157:H7+ *E. coli* J53) en presencia de Azida.



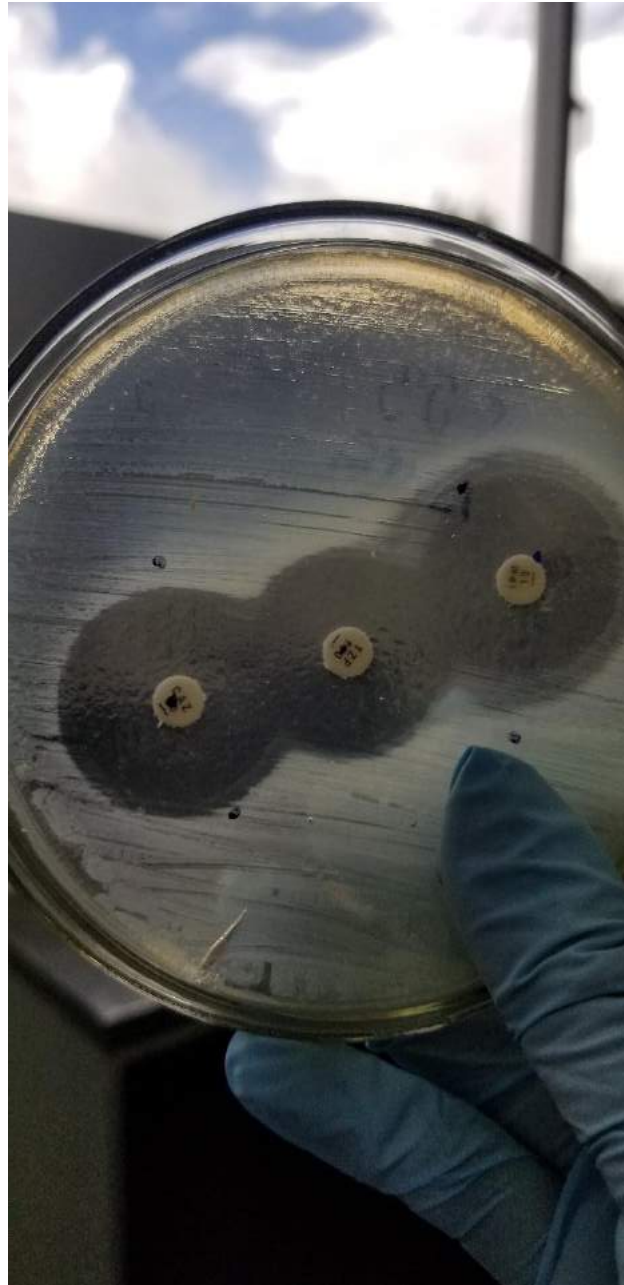


Anexo 3. Bacteria positiva a BLEE de manera fenotípica observados por el método del doble disco.





Anexo 4. Bacteria positiva a BLEE de manera fenotípica



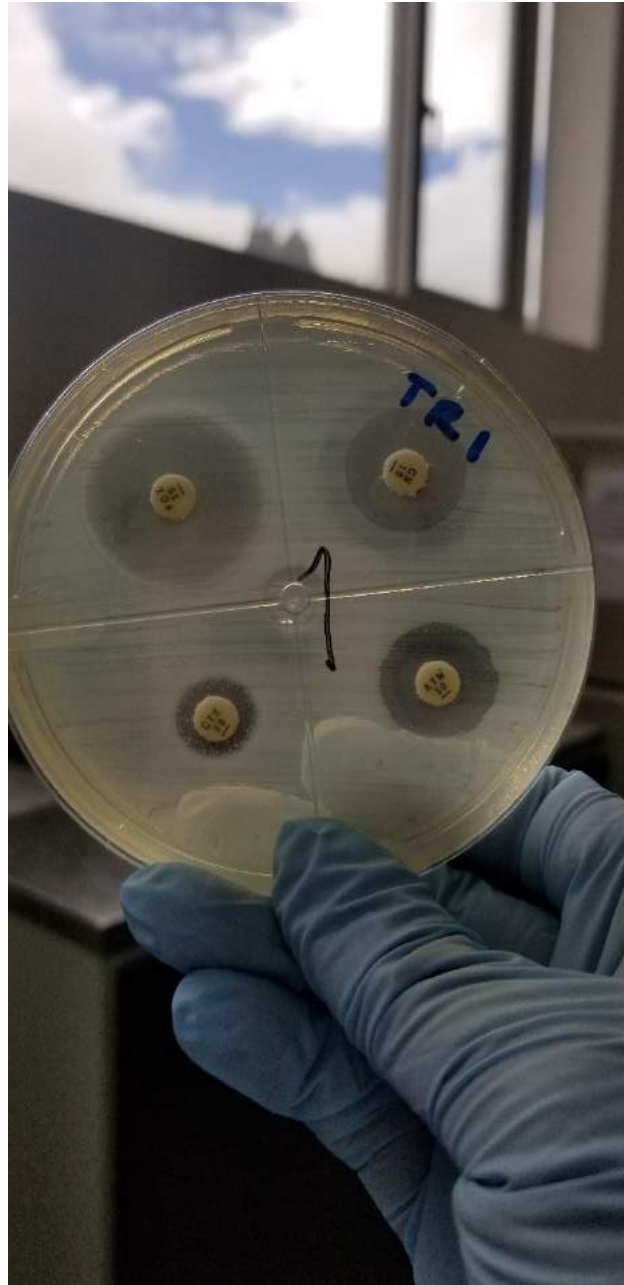


Anexo 5. Bacteria positiva a AmpC



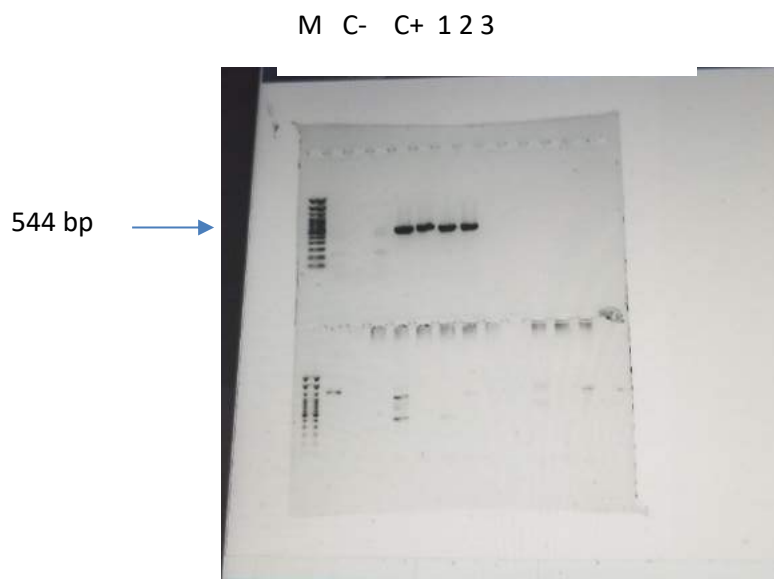


Anexo 6. Formación de halos de inhibición de una muestra positiva *E. coli* O157:H7.

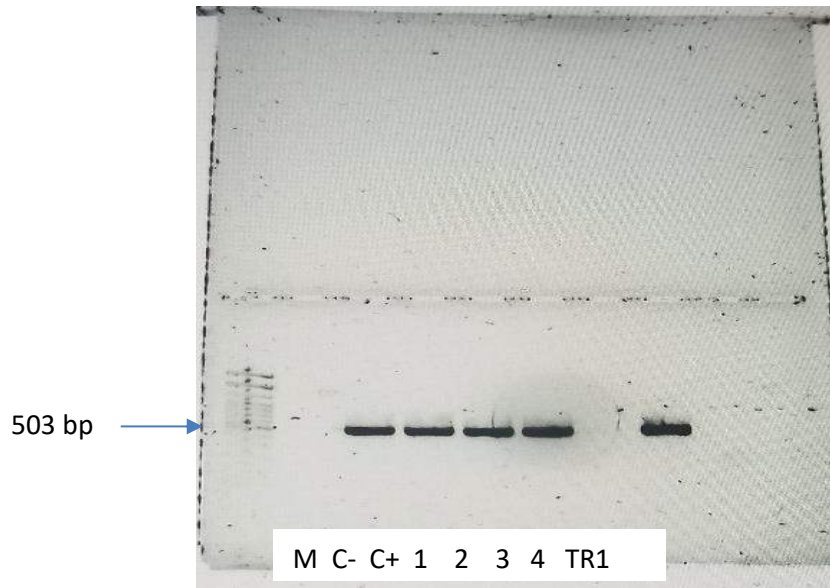




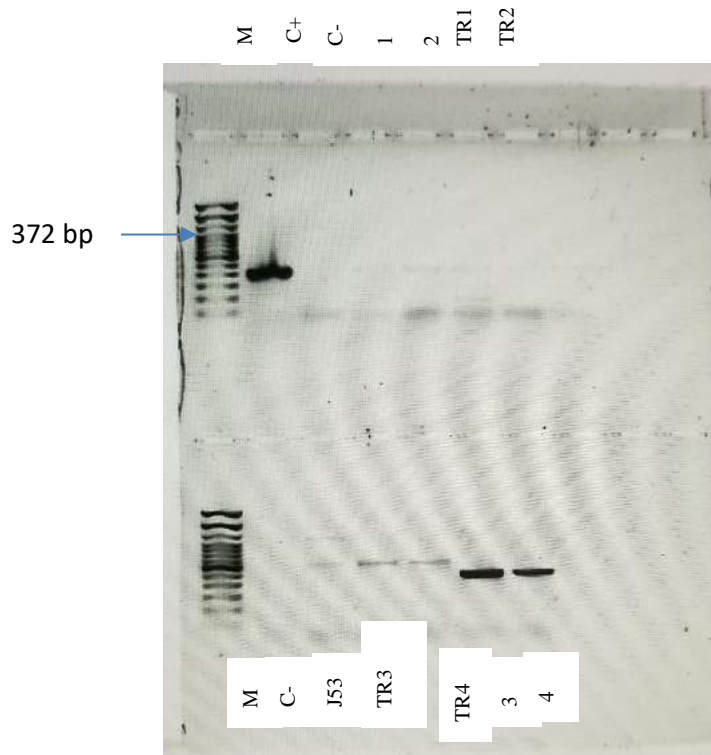
Anexo 7. Identificación de genes de resistencia CTX-M por PCR



Anexo 8. Identificación de genes de resistencia bla_{TEM} por PCR

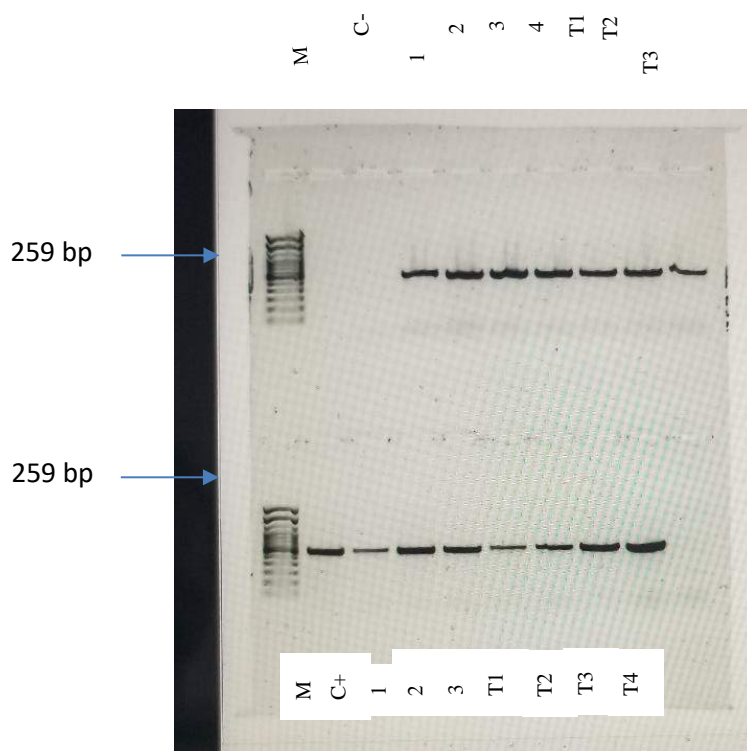


Anexo 9. Identificación de genes de resistencia *tetA* por PCR

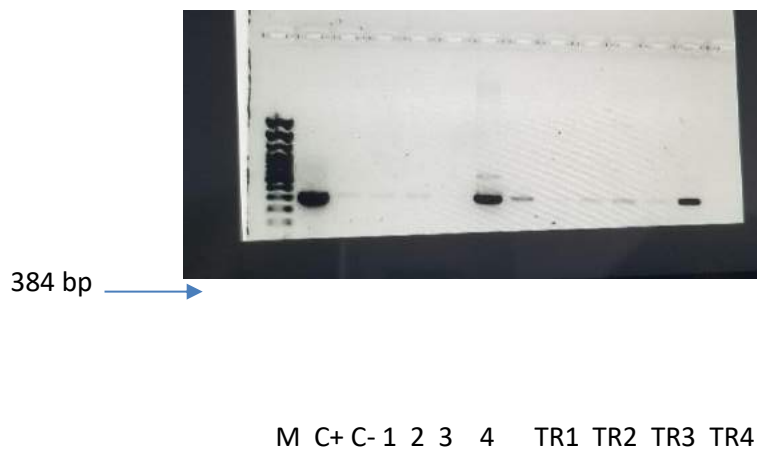




Anexo 10. Identificación de *E.coli* O157:H7 por PCR



Anexo 11. Identificación gen de resistencia *eae* por PCR





CVSP0 8a	12/01/2018	13/01/2018	Doméstico	Ambato	2	Canina	2 años	Shihzu	Hembra	Hisopado Rectal	vomito y diarrea. Dx: Gastroenteritis
CVSP0 8b	12/01/2018	13/01/2018	Doméstico	Ambato	2	Canina	2 años	Shihzu	Hembra	Hisopado Rectal	vomito y diarrea. Dx: Gastroenteritis
CVSP1 2Sa	12/01/2018	13/01/2018	Doméstico	Ambato	2	Canina	9 años	Doberman Pinscher	Macho	Hisopado Rectal	Sano
CVSP1 2Sb	12/01/2018	13/01/2018	Doméstico	Ambato	2	Canina	9 años	Doberman Pinscher	Macho	Hisopado Rectal	Sano
CVSP1 2Sc1	12/01/2018	13/01/2018	Doméstico	Ambato	2	Canina	9 años	Doberman Pinscher	Macho	Hisopado Rectal	Sano
CVSP1 2Sc2	12/01/2018	13/01/2018	Doméstico	Ambato	2	Canina	9 años	Doberman Pinscher	Macho	Hisopado Rectal	Sano
CVSP1 5Sa	12/01/2018	13/01/2018	Doméstico	Ambato	2	Canina	4 meses	Pitbull	Macho	Hisopado Rectal	Sano
CVSP1 5Sb	12/01/2018	13/01/2018	Doméstico	Ambato	2	Canina	4 meses	Pitbull	Macho	Hisopado Rectal	Sano
CVSP1 7Sa	12/01/2018	13/01/2018	Doméstico	Ambato	2	Canina	1 año	Shihzu	Macho	Hisopado Rectal	Sano
CVSP1 7Sb	12/01/2018	13/01/2018	Doméstico	Ambato	2	Canina	1 año	Shihzu	Macho	Hisopado Rectal	Sano
CVSP1 8Ea	18/01/2018	19/01/2018	Doméstico	Ambato	3	Canina	2 años	Bulldog Inglés	Macho	Hisopado Rectal	Vómito y diarrea. Dx: Gastroenteritis
CVSP1 8Eb	18/01/2018	19/01/2018	Doméstico	Ambato	3	Canina	2 años	Bulldog Inglés	Macho	Hisopado Rectal	Vómito y diarrea. Dx: Gastroenteritis
CVSP2 6Sa	20/01/2018	21/01/2018	Doméstico	Ambato	3	Canina	2 años	Pastor Alemán	Hembra	Hisopado Rectal	Sano



CVSP2 6Sb	20/01/2018	21/01/2018	Doméstico	Ambato	3	Canina	2 años	Pastor Alemán	Hembra	Hisopado Rectal	Sano
C2a	22/01/2018	23/01/2018	Callejero	Ambato	4	Canina	2 años	Mestizo	Macho	Hisopado Rectal	Herida Abrasiva
C2b	22/01/2018	23/01/2018	Callejero	Ambato	4	Canina	2 años	Mestizo	Macho	Hisopado Rectal	Herida Abrasiva
C2c	22/01/2018	23/01/2018	Callejero	Ambato	4	Canina	2 años	Mestizo	Macho	Hisopado Rectal	Herida Abrasiva
C14a	22/01/2018	23/01/2018	Callejero	Ambato	4	Canina	3 años	Mestizo	Macho	Hisopado Rectal	Sano
C14b	22/01/2018	23/01/2018	Callejero	Ambato	4	Canina	3 años	Mestizo	Macho	Hisopado Rectal	Sano
CVSP3 3Ea	25/01/2018	25/01/2018	Callejero	Ambato	5	Canina	6 años	Bulldog Francés	Macho	Hisopado Rectal	Secreción oculonasal. Dx: Distemper Canino
CVSP3 3Eb	25/01/2018	25/01/2018	Callejero	Ambato	5	Canina	6 años	Bulldog Francés	Macho	Hisopado Rectal	Secreción oculonasal. Dx: Distemper Canino
CVSP3 5E1	27/01/2018	28/01/2018	Doméstico	Ambato	5	Canina	1 mes	Shih-tzu	Macho	Hisopado Rectal	vomito y diarrea. Dx: GASTROENTERITIS
CVSP3 5E2	27/01/2018	28/01/2018	Doméstico	Ambato	5	Canina	1 mes	Shih-tzu	Macho	Hisopado Rectal	vomito y diarrea. Dx: GASTROENTERITIS



Muestra ID	Fecha de toma de Muestra	Fecha de Recepción en el Laboratorio de Bacteriología	Origen	Ciudad	# semana de estudio	Especie	Edad	Raza	Sexo	Tipo de Muestra (Origen)	Anamnesis
CVSP 37E1	27/01/2018	28/01/2018	Doméstico	Ambato	5	Canina	3 meses	Pitbull	Macho	Hisopado Rectal	vomito y diarrea. Dx: GASTROENTERITIS
CVSP 37E2	27/01/2018	28/01/2018	Doméstico	Ambato	5	Canina	3 meses	Pitbull	Macho	Hisopado Rectal	vomito y diarrea. Dx: GASTROENTERITIS
CVSP 39S	27/01/2018	28/01/2018	Doméstico	Ambato	5	Canina	2 años	Poodle	Hembra	Hisopado Rectal	Sano
CVSP 43S1	27/01/2018	28/01/2018	Callejero	Ambato	5	Canina	2 meses	Poodle	Hembra	Hisopado Rectal	Sano
CVSP 43S2	27/01/2018	28/01/2018	Callejero	Ambato	5	Canina	2 meses	Poodle	Hembra	Hisopado Rectal	Sano
CVSP 43S3	27/01/2018	28/01/2018	Callejero	Ambato	5	Canina	2 meses	Poodle	Hembra	Hisopado Rectal	Sano
CVSP 45E1a	27/01/2018	28/01/2018	Doméstico	Ambato	5	Canina	1 mes	Sharpei	Macho	Hisopado Rectal	vomito y diarrea. Dx: GASTROENTERITIS por parvovirus
CVSP 45E1b	27/01/2018	28/01/2018	Doméstico	Ambato	5	Canina	1 mes	Sharpei	Macho	Hisopado Rectal	vomito y diarrea. Dx: GASTROENTERITIS por parvovirus



							s				
CVSP 45E2	27/01/2018	28/01/2018	Doméstico	Ambato	5	Canina	1 mes	Sharpei	Macho	Hisopado Rectal	vomito y diarrea. Dx: GASTROENTERITIS por parvovirus
CVSP 45E3	27/01/2018	28/01/2018	Doméstico	Ambato	5	Canina	1 mes	Sharpei	Macho	Hisopado Rectal	vomito y diarrea. Dx: GASTROENTERITIS por parvovirus
CVSP 47E1	31/01/2018	31/01/2018	Doméstico	Ambato	5	Canina	9 años	Poodle	Macho	Hisopado Rectal	Vomito y diarrea. Dx: Gastroenteritis por hepatitis
CVSP 47E2	31/01/2018	31/01/2018	Doméstico	Ambato	5	Canina	9 años	Poodle	Macho	Hisopado Rectal	Vomito y diarrea. Dx: Gastroenteritis por hepatitis
CVSP 48E1	02/02/2018	02/02/2018	Doméstico	Ambato	5	Canina	12 años	Poodle	Macho	Hisopado Rectal	secrecion nasal, ocular. Dx: Traquebronquitis
CVSP 48E2	02/02/2018	02/02/2018	Doméstico	Ambato	5	Canina	12 años	Poodle	Macho	Hisopado Rectal	secrecion nasal, ocular. Dx: Traquebronquitis
C17a	02/02/2018	02/02/2018	Callejero	Cevallos	5	Canina	8 meses	Pitbull	Macho	Hisopado Rectal	Vómito intermitente Dx: Intususcepción
C17b	02/02/2018	02/02/2018	Callejero	Cevallos	5	Canina	8 meses	Pitbull	Macho	Hisopado Rectal	Vómito intermitente Dx: Intususcepción
CVSP 49a	03/02/2018	04/02/2018	Doméstico	Ambato	6	Canina	3 años	Mestizo	Macho	Hisopado Rectal	Vómito, diarrea. Dx: Gastroenteritis
CVSP	03/02/2018	004/02/2018	Doméstico	Ambato	6	Canin	3	Mest	Mac	Hisopado	Vómito, diarrea. Dx:



49b	018	018	co	o		a	años	izo	ho	Rectal	Gastroenteritis
CVSP 52a	03/02/2018	04/02/2018	Doméstico	Ambato	6	Canina	14 años	Labrador	Macho	Hisopado Rectal	Geriátrico, osteoartritis
CVSP 52b	03/02/2018	04/02/2018	Doméstico	Ambato	6	Canina	14 años	Labrador	Macho	Hisopado Rectal	Geriátrico, osteoartritis
CVSP 57a	03/02/2018	04/02/2018	Callejero	Ambato	6	Canina	3 años	Mestizo	Macho	Hisopado Rectal	secrecion nasal, ocular. Dx: Traquebronquitis
CVSP 57b	03/02/2018	04/02/2018	Callejero	Ambato	6	Canina	3 años	Mestizo	Macho	Hisopado Rectal	secrecion nasal, ocular. Dx: Traquebronquitis
C18a	07/02/2018	08/02/2018	Callejero	Ambato	7	Canina	2 años	Mestizo	Hembra	Hisopado Rectal	Sano
C18b	07/02/2018	08/02/2018	Callejero	Ambato	7	Canina	2 años	Mestizo	Hembra	Hisopado Rectal	Sano
C19a	07/02/2018	08/02/2018	Callejero	Ambato	7	Canina	2 años	Mestizo	Hembra	Hisopado Rectal	Sano
C19b	07/02/2018	08/02/2018	Callejero	Ambato	7	Canina	2 años	Mestizo	Hembra	Hisopado Rectal	Sano
C20a	07/02/2018	08/02/2018	Callejero	Ambato	7	Canina	16 años	Mestizo	Hembra	Hisopado Rectal	Sano
C20b	07/02/2018	08/02/2018	Callejero	Ambato	7	Canina	16 años	Mestizo	Hembra	Hisopado Rectal	Sano
C29a	07/02/2018	08/02/2018	Callejero	Ambato	7	Canina	7 años	Mestizo	Hembra	Hisopado Rectal	Sano



							s				
--	--	--	--	--	--	--	---	--	--	--	--

Muestra ID	Fecha de toma de Muestra	Fecha de Recepción en el Laboratorio de Bacteriología	Origen	Ciudad	# semana de estudio	Especie	Edad	Raza	Sexo	Tipo de Muestra (Origen)	Anamnesis
C29b	07/02/2018	08/02/2018	Callejero	Ambato	7	Canina	7 años	Mestizo	Hembra	Hisopado Rectal	Sano
C30a	07/02/2018	08/02/2018	Callejero	Ambato	7	Canina	9 años	Mestizo	Hembra	Hisopado Rectal	Sano
C30b	07/02/2018	08/02/2018	Callejero	Ambato	7	Canina	9 años	Mestizo	Hembra	Hisopado Rectal	Sano
CVSP60a	09/02/2018	09/02/2018	Doméstico	Ambato	7	Canina	9 años	Sharpei	Macho	Hisopado Rectal	Sarna Demodéica
CVSP60b	09/02/2018	09/02/2018	Doméstico	Ambato	7	Canina	9 años	Sharpei	Macho	Hisopado Rectal	Sarna Demodéica
CVSP61a	09/02/2018	09/02/2018	Doméstico	Ambato	7	Canina	6 meses	Schnautzer	Hembra	Hisopado Rectal	Vomito, diarrea. Dx: Gastroenteritis por parvovirus
CVSP61b	09/02/2018	09/02/2018	Doméstico	Ambato	7	Canina	6 meses	Schnautzer	Hembra	Hisopado Rectal	Vomito, diarrea. Dx: Gastroenteritis por parvovirus
CVSP62a	10/02/2018	11/02/2018	Doméstico	Ambato	7	Canina	4 meses	Pekineses	Hembra	Hisopado Rectal	Sano



CVSP62 b	10/02/2018	11/02/2018	Doméstico	Ambat o	7	Canina	4 mes es	Pekinés	Hem bra	Hisopado Rectal	Sano
CVSP6 8a	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambat o	8	Canina	15 años	Poodle	Mach o	Hisopado Rectal	Sano
CVSP68 b	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambat o	8	Canina	15 años	Poodle	Mach o	Hisopado Rectal	Sano
CVSP6 9a	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambat o	8	Canina	2 año s	Dober man	Mach o	Hisopado Rectal	Sano
CVSP69 b	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambat o	8	Canina	2 año s	Dober man	Mach o	Hisopado Rectal	Sano
CVSP7 3a	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambat o	8	Canina	10 años	Poodle	Hem bra	Hisopado Rectal	Osteoartritis
CVSP73 b	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambat o	8	Canina	10 años	Poodle	Hem bra	Hisopado Rectal	Osteoartritis
CVSP7 6a	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambat o	8	Canina	2 año s	Yorks hire	Hem bra	Hisopado Rectal	Sano
CVSP76 b	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambat o	8	Canina	2 año s	Yorks hire	Hem bra	Hisopado Rectal	Sano
CVSP7 7a	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambat o	8	Canina	8 año s	Mestiz o	Mach o	Hisopado Rectal	Sano
CVSP77 b	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambat o	8	Canina	8 año s	Mestiz o	Mach o	Hisopado Rectal	Sano
CVSP7 9a	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambat o	8	Canina	4 mes es	Mestiz o	Hem bra	Hisopado Rectal	Sano



CVSP79 b	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	4 meses	Mestizo	Hembra	Hisopado Rectal	Sano
CVPP02 a	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	6 años	Schnautzer	Hembra	Hisopado Rectal	Raquitismo
CVPP02 b	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	6 años	Schnautzer	Hembra	Hisopado Rectal	Raquitismo
CVPP03 a	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	3 meses	Poodle	Hembra	Hisopado Rectal	Sano
CVPP03 b	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	3 meses	Poodle	Hembra	Hisopado Rectal	Sano
CVPP04 a	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	8 años	Mestizo	Hembra	Hisopado Rectal	Dermatitis
CVPP04 b	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	8 años	Mestizo	Hembra	Hisopado Rectal	Dermatitis
CVPP05 a	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	6 meses	Cocker spaniel	Hembra	Hisopado Rectal	Distemper canino
CVPP05 b	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	6 meses	Cocker spaniel	Hembra	Hisopado Rectal	Distemper canino



Muestra ID	Fecha de toma de Muestra	Fecha de Recepción en el Laboratorio de Bacteriología	Origen	Ciudad	# semana de estudio	Especie	Edad	Raza	Sexo	Tipo de Muestra (Origen)	Anamnesis
CVPP06	23/02/2018	23/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	3 años	Mestizo	Hembra	Hisopado Rectal	Sano
CVPP07a1	23/02/2018	23/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	5 meses	Poodle	Macho	Hisopado Rectal	Distemper canino
CVPP07a2	23/02/2018	23/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	5 meses	Poodle	Macho	Hisopado Rectal	Distemper canino
CVPP07b1	23/02/2018	23/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	5 meses	Poodle	Macho	Hisopado Rectal	Distemper canino
CVPP07b2	23/02/2018	23/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	5 meses	Poodle	Macho	Hisopado Rectal	Distemper canino
CVPP07c	23/02/2018	23/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	5 meses	Poodle	Macho	Hisopado Rectal	Distemper canino
CVPP08	23/02/2018	23/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	14 años	Golden Retriever	Macho	Hisopado Rectal	Secreción nasal y ocular. Dx: Neumonía
CVSP81a	23/02/2018	23/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	3 meses	Pitbull	Macho	Hisopado Rectal	Vómito, diarrea. Dx: Gastroenteritis por parvovirus.
CVSP81b	23/02/2018	23/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	3 meses	Pitbull	Macho	Hisopado Rectal	Vómito, diarrea. Dx: Gastroenteritis por parvovirus.



CVSP83a	23/02/2018	23/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	10 años	Poodle	Macho	Hisopado Rectal	Secreción nasal y ocular. Dx: Traqueobronquitis
CVSP83b	23/02/2018	23/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	10 años	Poodle	Macho	Hisopado Rectal	Secreción nasal y ocular. Dx: Traqueobronquitis
C36	23/02/2018	23/02/2018	Callejero	Cevallos	8	Canina	4 años	Mestizo	Macho	Hisopado Rectal	Sano
CVSP84	24/02/2018	25/02/2018	Doméstico	Ambato	9	Canina	4 meses	Mestizo	Macho	Hisopado Rectal	Sano
CVSP85	24/02/2018	25/02/2018	Doméstico	Ambato	9	Canina	3 años	Teckel	Macho	Hisopado Rectal	Politraumatizado
CVSP89	24/02/2018	25/02/2018	Doméstico	Ambato	9	Canina	1 año	Boxer	Hembra	Hisopado Rectal	Vómito, diarrea. Dx: Gastroenteritis
CVSP93	24/02/2018	25/02/2018	Doméstico	Ambato	9	Canina	2 meses	Poodle	Macho	Hisopado Rectal	Vómito, diarrea. Dx: Gastroenteritis
CVSP94	24/02/2018	25/02/2018	Doméstico	Ambato	9	Canina	3 años	Pitbull	Hembra	Hisopado Rectal	Sano, Gestante
CVSP95a	24/02/2018	25/02/2018	Doméstico	Ambato	9	Canina	4 años	Pitbull	Macho	Hisopado Rectal	Sano, control vacunal
CVSP95b	24/02/2018	25/02/2018	Doméstico	Ambato	9	Canina	4 años	Pitbull	Macho	Hisopado Rectal	Sano, control vacunal
CVSP98a	24/02/2018	25/02/2018	Doméstico	Ambato	9	Canina	2 meses	Bull Terrier	Hembra	Hisopado Rectal	Vómito, diarrea. Dx: Gastroenteritis
CVSP98b	24/02/2018	25/02/2018	Doméstico	Ambato	9	Canina	2 meses	Bull Terrier	Hembra	Hisopado Rectal	Vómito, diarrea. Dx: Gastroenteritis
CVSP99	24/02/2018	25/02/2018	Doméstico	Ambato	9	Canina	2 meses	Bull Terrier	Macho	Hisopado Rectal	Vómito, diarrea. Dx: Gastroenteritis



							es	r			
CVPP12 a	24/02/20 18	25/02/20 18	Doméstico	Ambat o	9	Canina	3 años	Schna utzer	Mach o	Hisopado Rectal	Intoxicación
CVPP12 b	24/02/20 18	25/02/20 18	Doméstico	Ambat o	9	Canina	3 años	Schna utzer	Mach o	Hisopado Rectal	Intoxicación
CVSP10 0a	27/02/20 18	27/02/20 18	Doméstico	Ambat o	9	Canina	10 años	Poodl e	Hem bra	Hisopado Rectal	Neoplasias
CVSP10 0b	27/02/20 18	27/02/20 18	Doméstico	Ambat o	9	Canina	10 años	Poodl e	Hem bra	Hisopado Rectal	Neoplasias
C37	27/02/20 18	27/02/20 18	Callejero	Cevall os	9	Canina	5 años	Mesti zo	Mach o	Hisopado Rectal	Sano

Anexo 13. Muestras positivas para *E. coli* O157:H7 con sus respectivos transconjugados y la identificación de genes de resistencia

Cepas	Origen	BLEE	Ampc	O157:H7	<i>eaeA</i>	<i>hly_a</i>	<i>Stx1</i>	<i>Stx2</i>	<i>Sul1</i>	<i>TetA</i>	<i>Qnra/QnrS</i>	<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{CTX-M}</i>	<i>bla_{shv}</i>
CVSP17Sa	Doméstico CVSP	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
CVSP17Sb	Doméstico CVSP	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
CVSP18Ea	Doméstico CVSP	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
CVSP15Sa	Doméstico CVSP	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
TR1	Laboratorio	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
TR2	Laboratorio	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
TR3	Laboratorio	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
TR4	Laboratorio	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J53	Laboratorio	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Anexo 14. Halos de inhibición de *E. coli* O157:H7

Abreviatura	S	I	R	CVSP17Sa	CVSP17Sb	CVSP18Ea	CVSP15Sa	TR1	TR2	TR3	TR4	J53
CN10	>15	13-14	<14	16	16	18	18	16	16	16	16	16
ATM30	>21	18-20	<17	18	19	18	18	18	18	19	18	27
CTK30	>26	23-25	<22	11	12	14	22	15	23	25	23	28
FOX30	>18	15-17	<14	24	25	23	22	24	25	26	25	27
CIP5	>21	16-20	<15	17	16	19	17	20	20	17	17	23
MEM10	>23	20-22	<19	24	25	24	24	26	25	24	25	25
AK30	>17	15-16	<14	17	18	19	17	19	17	17	18	16
CT10	>11	8-9	<10	9	8	8	8	8	9	9	11	12
ENR5	>23	17-22	<16	15	12	12	20	25	24	25	26	26
NA30	>19	14-18	<13	6	21	20	22	20	19	20	21	21
SXT25	>16	11-15	<10	6	6	12	10	27	23	25	27	23
SAM20	>15	12-14	<11	12	13	13	12	12	14	12	12	19
AMP10	>17	14-16	<13	6	6	12	10	6	6	12	10	18
VA30	>17	15-16	<14	6	6	6	6	6	6	6	6	6
E15	>23	14-22	<13	6	6	8	8	10	12	10	10	12



Anexo 15. Interpretación de halos de inhibición.

Antibiótico	Abreviatura	Sensible (mm)	Intermedio (mm)	Resistente (mm)
Amikacina	AK30	>17	15-16	<14
Gentamicina	CN10	>15	13-14	<12
Piperacilina/ Tazobactam	TZP	>21	18-20	<17
Aztreonam	ATM30	>21	18-20	<17
Amoxicilina/Ac. Clavulánico	AMC30	>18	14-17	<13
Ampicilina/Sulbactam	SAM20	>15	12-14	<11
Meropenem	MEM10	>23	20-22	<19
Imipenem	IMP10	>23	20-22	<19
Cefepime	FEP30	>25	19-24	<18
Ceftriaxona	CRO30	>23	20-22	<19
Ceftazidina	CAZ30	>21	18-20	<17
Cefotaxima	CTK30	>26	23-25	<22
Cefoxitin	FOX	>18	15-17	<14



Ciprofloxacina	CIP5	>21	16-20	<15
Ac. Nalidíxico	NA30	>19	14-18	<13
Eritromicina	E15	>23	14-22	<13
Colistina	CT10	>11		<10
Sulfametoxazol/Trimetropin	SXT25	>16	11-15	<10
Vancomicina	VA30	>17	15-16	<14
Ampicilina	AMP10	>17	14-16	<13
Enrofloxacina	ENR5	>23	17-22	<16

Fuente: (CLSI, 2020)