



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Medicina
Licenciatura en Biomedicina
Eje de Microbiología

“Resistencia a antibióticos β - lactámicos y producción de BLEE, en cepas de *Escherichia coli* multirresistentes, aisladas de mascotas y sus dueños”

Tesis profesional para obtener el título:

Licenciado en Biomedicina

Presenta:

Flor Yazmin Abad Bolaños

Directora de tesis:

Dra. Rosa del Carmen Rocha Gracia

Puebla Pue., Noviembre 2018.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES Y ACADÉMICOS

- A la licenciatura en Biomedicina por ser mi lugar de aprendizaje y realización académica, proporcionarme un sinfín de conocimiento que será útil en mi vida profesional y a pesar de haber sido una tarea muy complicada hoy concluyo con excelentes bases en el conocimiento de la ciencia.
- A mi asesora de tesis, la D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia por la confianza y la paciencia que me brindó para poder realizar este proyecto y por ser una excelente guía en la elaboración de esta tesis.
- Al laboratorio de Microbiología hospitalaria y de la comunidad del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por haberme permitido realizar mi tesis y aprender acerca del interesante campo de la microbiología.
- Al hospital de pequeñas especies de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por permitirme la entrada para poder recolectar las muestras utilizadas en mi tesis.
- Al M.C Edwin Barrios ya que desde mi llegada al laboratorio me apoyo en cada momento y durante mi estancia en el laboratorio y la realización de mi tesis.
- Al M.V.Z Rafael Erazo Hernández por sus enseñanzas y ayuda en el hospital de pequeñas especies de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

- **A Dios**

Porque sin su guía y sin la fortaleza que mediante mi fé, no hubiera sido posible superar esta difícil etapa de mi vida, la cual fue la terminación de la licenciatura y el reto de realizar mi tesis.

- **A mis Padres**

Flor y Abel

Por haber sido el pilar más importante en mi vida y en mi formación académica ya que sin sus consejos, sus palabras de aliento, su apoyo incondicional y el gran esfuerzo que realizaron esto no hubiera sido posible. Por brindarme siempre su infinito amor y creer en mi incluso cuando yo desistía.

Esto no es solo un logro mío también es de ustedes.

- **A mis amigos**

Por brindarme siempre su apoyo incondicional durante esta etapa, por siempre estar cuando más los necesitaba y brindarme lo mejor de ustedes.

- **A mis compañeros de laboratorio**

Por brindarme su apoyo con dudas, con los experimentos y su conocimiento, por el compañerismo y ayudarme en momentos que difíciles dentro del laboratorio

INDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Clasificación de antibióticos según mecanismo de acción.	17
2	Clasificación de las penicilinas.	19
3	Clasificación de las cefalosporinas.	20
4	Mecanismo de acción y resistencia de las familias de antibióticos.	24
5	Clasificación de CTX-M.	26
6	Antibióticos, concentración y diámetro del halo de inhibición (en milímetros) utilizados en la determinación del perfil de resistencia a los 17 antibióticos.	40
7	Preparación de la mezcla de reacción.	43
8	Tamaño de los amplificadores esperados de los genes de resistencia.	46
9	Resultado de las pruebas bioquímicas de las 42 cepas.	48
10	Perfil de resistencia a antibióticos de las cepas de <i>E. coli</i> .	51
11	Resistencia a fenotipo BLEE.	58

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	Mecanismo de acción de antibióticos.	18
2	Esquema de trabajo para determinar el perfil de resistencia en las cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de humanos y mascotas.	40
3	Esquema de trabajo para determinar el fenotipo BLEE en las cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de humanos y mascotas.	42
4	Placas McConkey sembradas con <i>E. coli</i> .	47
5	Total de muestras sembradas y posibles como <i>E. coli</i> .	48
6	Patrón en “cola de pescado” indicador de la presencia del fenotipo BLEE.	59
7	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación del gen <i>bla</i> _{TEM} .	61
8	Electroforesis del gen <i>bla</i> _{CTXM-U} en parejas.	62
9	Electroforesis de gel 1 de parejas de cepas (humano/mascota) del gen <i>bla</i> _{CTXM-1} .	63
10	Electroforesis de gel 1 de parejas de cepas (humano/mascota) del gen <i>bla</i> _{SHV} .	63
11	Alineamiento de la secuencia del extremo amino terminal del gen. <i>bla</i> _{CTXM-15} de la pareja de cepas 2H y 2P.	65
12	Alineamiento de la secuencia del	66

extremo amino terminal del gen
*bla*_{CTXM-15} de la pareja de cepas 17H
y 17P3.

13

Alineamiento de secuencia del
extremo amino terminal del gen
*bla*_{CTXM-15} de la pareja 20H y 20P.

68

14

Alineamiento de la secuencia del
extremo amino terminal del gen
*bla*_{CTXM-15} de la pareja 21H y 21P.

69

INDICE DE GRAFICAS

Gráfica	Título	Página
1	Perfil de resistencia del total de cepas.	53
2	Gráfica que muestra perfil de susceptibilidad de las cepas de <i>E. coli</i> obtenidas de la pareja humano-perro: 2H y 2P.	54
3	Gráfica que muestra perfil de susceptibilidad de las cepas de <i>E. coli</i> obtenidas de la pareja humano-perro: 17H y 17P3.	55
4	Gráfica que muestra perfil de susceptibilidad de las cepas de <i>E. coli</i> obtenidas de la pareja humano-perro: 20H1 y 21P1.	56
5	Gráfica que muestra perfil de susceptibilidad de las cepas de <i>E. coli</i> obtenidas de la pareja humano-perro: 21H y 21P.	57
6	Fenotipo BLEE en cepas totales.	59
7	Fenotipo BLEE en parejas.	60

Lista de Abreviaturas

ADP Adenosin Difosfato

PBP Proteinas de unión a penicilina

DNA Ácido desoxirribunucleico

BLEE Betalactamasa de espectro extendido

CTX Cefotaxima

AMC Amoxicilina con ácido clavulánico

FEP Cefepime

CAZ Ceftazidima

ATM Aztreonam

AM Ampicilina

CTX Cefotaxima

CAZ Ceftazidima

AMC Amoxicilina con ácido clavulánico

FEP Cefepime

ATM Aztreonam

IPM Imipenem

MEM Meropenem

AN Amikacina

GM Gentamicina

S Estreptomicina

TE Tetraciclina

CIP Ciprofloxacino

NA Acido nalidíxico

SXT Trimetropim con sulfametoxasol

C Cloranfenicol

FOX Cefoxitina

CRO Ceftriaxona

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

BHI Infusión Cerebro Corazón

LIA Agar Hierro Lisina

MIO Movilidad Indol Ornitina

TSI Agar Hierro Triple Azúcar

CIT Citrato

FEN Fenilalanina

MR-VP Rojo de Metilo-Voges Proskauer

URE Urea de Christensen

TSA Agar Soya Trypticaseina

CTXM β -lactamasa derivada de la contracción "Cefotaximasa aislada en Munich"

TEM β -lactamasa derivada de la contracción del nombre griego "Temoniera"

SHV β -lactamasa derivada de la contracción "Sulfhidril Variable"

E. coli *Escherichia coli*

μ g Microgramo

INDICE

INDICE DE TABLAS	4
INDICE DE FIGURAS	5
INDICE DE GRAFICAS	7
ABREVIATURAS	8
1. INTRODUCCION	15
2. MARCO TEORICO	15
2.1. Importancia de <i>Escherichia coli</i> en mascotas y sus dueños	16
2.2. Antibióticos	17
2.3. Clasificación de Antibióticos β-Láctamicos	18
2.4. Resistencia Bacteriana	21
2.5. β- Lactamasas de Espectro Extendido	25
3. ANTECEDENTES	28
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
5. JUSTIFICACION	30
6. OBJETIVOS	31
6.1 Objetivo general	31
6.2 Objetivos específicos	31

7. HIPOTESIS	32
8. DISEÑO DE LA INVESTIGACION	33
8.1. Diseño del estudio	33
8.2. Ubicación espacio-temporal	33
8.3. Muestreo	33
8.3.1 Definición de la muestra	33
8.3.2 Selección de la muestra	33
8.3.3 Criterios de selección de unidades de muestreo	34
8.4. Diseño y tipo de muestreo	35
8.5. Tamaño de la muestra	35
8.6. Definición de las variables y escala de medición	35
8.7. Método y recolección de datos	35
8.8. Recursos humanos	35
8.9. Recursos materiales	36

8.10. Recursos financieros	36
8.11. Bioética	36
9. MATERIAL Y METODOS	37
9.1. Estrategia de Trabajo	37
9.2. Identificación de <i>Escherichia coli</i> en muestras de heces fecales	38
9.3. Determinación del perfil de resistencia	40
9.4. Producción de β -Lactamasas de Espectro Extendido (BLEE)	41
9.5. Amplificación de genes BLEE	42
9.6. Obtención de templado de DNA por el método de hervido	42
9.7. Visualización de productos de PCR	45
9.8. Detección de genes de resistencia	46
10. RESULTADOS	47
11. DISCUSIÓN	70

12. CONCLUSIONES	73
13. PERSPECTIVAS	73
14. ANEXOS	74
15. BIBLIOGRAFÍA	83

Resumen

Los antibióticos β -lactámicos constituyen el grupo de fármacos elegidos como tratamiento de primera elección para infecciones causadas por Enterobacterias, se ha observado que el mal uso y abuso de antibióticos, promueve la generación de mecanismos de resistencia. Actualmente el fracaso terapéutico en las infecciones por Enterobacterias ha hecho que los estudios se dirijan hacia la descripción de los mecanismos de resistencia de estas bacterias y se ha comprobado la presencia de bacterias productoras de enzimas capaces de inactivar antibióticos β -lactámicos (BLEE). La presencia de bacterias multirresistentes y productoras de BLEE es un grave problema de la comunidad y de salud pública por su impacto económico y clínico que va en aumento por lo que es de suma importancia estudiarlo principalmente si se presentan cepas bacterianas en mascotas sanas que puedan funcionar como reservorios de bacterias multirresistentes y que puedan transmitirlos a los humanos con los que conviven frecuentemente o viceversa, ocasionado una combinación de información genética de cepas de origen animal y humanas generando bacterias que les permitan obtener más características de resistencia y/o virulencia. En este trabajo se obtuvieron 33 muestras de heces fecales, 14 de humanos y 19 de perros y de estas, 8 fueron parejas, en las cuales se identificó la bacteria *E. coli*. Se probaron diferentes antibióticos β -lactámicos y de otras familias para determinar el perfil de susceptibilidad y se obtuvo multirresistencia en las cepas y un alto índice de resistencia a los β -lactámicos. Se buscó la presencia de los genes de BLEE *bla*_{TEM}, *bla*_{CTXM-1} y *bla*_{SHV} en las cepas de perros y humanos y posteriormente se seleccionaron las 8 cepas de parejas (Perro y dueño) y se realizó secuenciación del extremo amino terminal.

Mediante herramientas bioinformáticas se observó que algunas cepas tenían correspondencia con una o dos variantes del grupo de las CTX-M-1 (CTX-M-1, 15, 123) por lo que sería interesante realizar la secuenciación completa del gen para poder identificar claramente de que variante se trata.

INTRODUCCION

MARCO TEORICO

Los animales han acompañado a los seres humanos desde la época de las cavernas, las pinturas rupestres nos demuestran la cohabitación entre humanos y animales. Con el tiempo aprendimos a estar más cerca de ellos y se pudo domesticar a varias especies mejorando la calidad de vida de la humanidad (Montés, 2001).

Se tiene registro que desde la época prehispánica en México existió la domesticación de animales, y en especial del perro ya que poseía un valor alimenticio, material y religioso. Sin embargo, al pasar los años el perro se convirtió en el principal animal de compañía de los seres humanos.

El número de perros y gatos ha aumentado substancialmente en la sociedad moderna, de acuerdo con el censo 2016 del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), México es el país de la región de América Latina con el mayor número de perros en la región, con aproximadamente 19.5 millones en todo el país.

Esto se traduce en que 7 de cada 10 hogares en México cuentan con una mascota, de hecho, el Consejo Nacional de Población (CONAPO) revela que el número de perros domésticos aumentó 20% del año 2000 al 2010; mientras que, alrededor del 80% de los habitantes con mascotas tiene caninos en su hogar.

La relación entre animales de compañía y humanos ha cambiado radicalmente a través de los años debido a que los perros son cada vez más cercanos a los humanos. Mientras en el pasado los perros usualmente se mantenían en la parte exterior de las casas, en la actualidad es cada vez más común que se encuentren dentro de la casa e inclusive duermen en la cama de sus dueños. Debido a esto, puede darse un intercambio de flora bacteriana multirresistente entre ambos, por lo que los perros representan una fuente potencial de diseminación de resistencia a antibióticos, la cual es adquirida debido al mal uso y abuso de agentes antimicrobianos en los tratamientos de estos animales (Gutierrez *et al.*, 2007).

Se ha reportado que el perro como principal animal de compañía, habitualmente alberga múltiples cepas bacterianas de interés clínico, entre las que se encuentra *Escherichia coli*, siendo el principal patógeno y agente causal de infecciones entéricas, urinarias y sistémicas (Clapper, 1962).

Escherichia coli tiene amplia distribución ya que, además de habitar en el tracto gastrointestinal de animales de sangre caliente, se encuentra contaminando la vegetación, el agua y el suelo. Existen varios patotipos que pueden causar enfermedades en humanos: *E. coli* enteropatogénica (EPEC), enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva

(EIEC) y extraintestinales: UPEC (asociada a infecciones de vías urinarias), AIEC (asociado a epitelio intestinal) y NMEC (asociada a meningitis) (Ángeles *et al.*, 2002).

Estudios epidemiológicos moleculares han clasificado a las diferentes cepas de *E. coli* en filogrupos. El esquema de Clermont clasifica las cepas de *E. coli* en 2 grandes grupos: extraintestinales (filogrupos B2 y D) e intestinales (filogrupos B1 y A). Algunos de estos filogrupos se encuentran asociados a infecciones de diversos animales incluyendo al humano, como los de los filogrupos C, D y B2 (Clermont *et al.*, 2013).

Las bacterias resistentes pueden ser adquiridas por los humanos a través de diferentes vías, entre las cuales encontramos transmisión de persona a persona, exposición ambiental y exposición directa a animales. Esta transmisión zoonótica se produce principalmente por vía fecal-oral, ya que las heces del canino son una fuente de agentes patógenos transmisibles (Damborg *et al.*, 2016).

2.1 Importancia de *E. coli* en mascotas y sus dueños

El contacto cercano entre mascotas domésticas y humanos ofrece condiciones favorables para la transmisión de bacterias por contacto directo o a través del ambiente doméstico. Los niños son los que presentan más riesgo de infección que los adultos porque ellos tienen un acercamiento físico mayor con perros y gatos, así como también la exposición al ambiente contaminado por las mascotas (Gutierrez *et al.*, 2007).

Se ha observado que las bacterias comensales que se encuentran en humanos pueden ser transmitidas a las mascotas (antropozoonosis) y pueden adquirir genes de resistencia de la flora comensal de las mascotas para posteriormente ser seleccionadas por tratamientos antimicrobianos en estos animales (Dabanch., 2003). Sin embargo, en el caso de transmisión de perros a humanos (zoonosis), se sugiere que las mascotas contribuyen a la adquisición por parte de los humanos de bacterias resistentes debido a la diseminación de heces fecales en el medio ambiente (Guardabassi *et al.*, 2004).

Generalmente cuando se presentan infecciones en humanos por *E. coli* se utilizan como primera elección antibióticos β -lactámicos en general, principalmente cefalosporinas de tercera y cuarta generación, monobactams, así como sulfanomidas, tetraciclinas y quinolonas (Solezzi.,1997). Por otra parte, para animales de compañía los antibióticos más frecuentemente usados para tratar infecciones causadas por enterobacterias son penicilinas, cefalosporinas, macrólidos, lincosamidas, tetraciclinas, fenicoles, sulfanomidas, aminoglucósidos y quinolonas (Saldaña *et al.*, 2014).

Los antibióticos β -lactámicos constituyen un grupo de fármacos con acción bactericida para el tratamiento de las infecciones bacterianas, se ha visto que el mal uso y abuso de estos antibióticos, promueve la generación de mecanismos de resistencia (Pereyra *et al.*, 2013). Actualmente el fracaso terapéutico en las infecciones por enterobacterias ha hecho que los estudios se dirijan hacia la descripción de los mecanismos de resistencia de estas bacterias y se ha comprobado la presencia de bacterias productoras de enzimas capaces de inactivar antibióticos β -lactámicos (BLEE) (Morejón., 2013).

La rápida emergencia de las BLEE en los últimos años ha suscitado un gran interés hacia el conocimiento de los mecanismos de resistencia producidos por la presencia de estas enzimas, debido a que se considera un problema serio de salud pública por sus implicaciones clínicas y económicas.

2.2 Antibióticos

Los antibióticos son sustancias naturales o sintéticas, que inhiben el crecimiento o la proliferación de bacterias (bacteriostáticos) o que directamente las matan (bactericidas). Los antibióticos de acuerdo al mecanismo de acción se clasifican de la siguiente manera: (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de antibióticos según mecanismo de acción

Mecanismo de acción	Ejemplos
Inhibición de la síntesis de pared celular	Penicilinas, cefalosporinas, vancomicina, bacitracina, oxacilina, nafcilina
Daño a membrana plasmática	Polimixina, nistatina, anfotericina B
Inhibición de síntesis de proteínas	Aminoglucósidos, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina
Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos	Rifamicina, actinomicina D, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, norfloxacina
Antimetabolitos	Trimetropim, sulfanomidias
Inhibidores de betalactamasas	Sulbactam, clavulanato, tazobactam
Antifímicos	Etambutol, pirazinamida, isoniazida, estreptomina, rifampicina

Tomado de López, 2011.

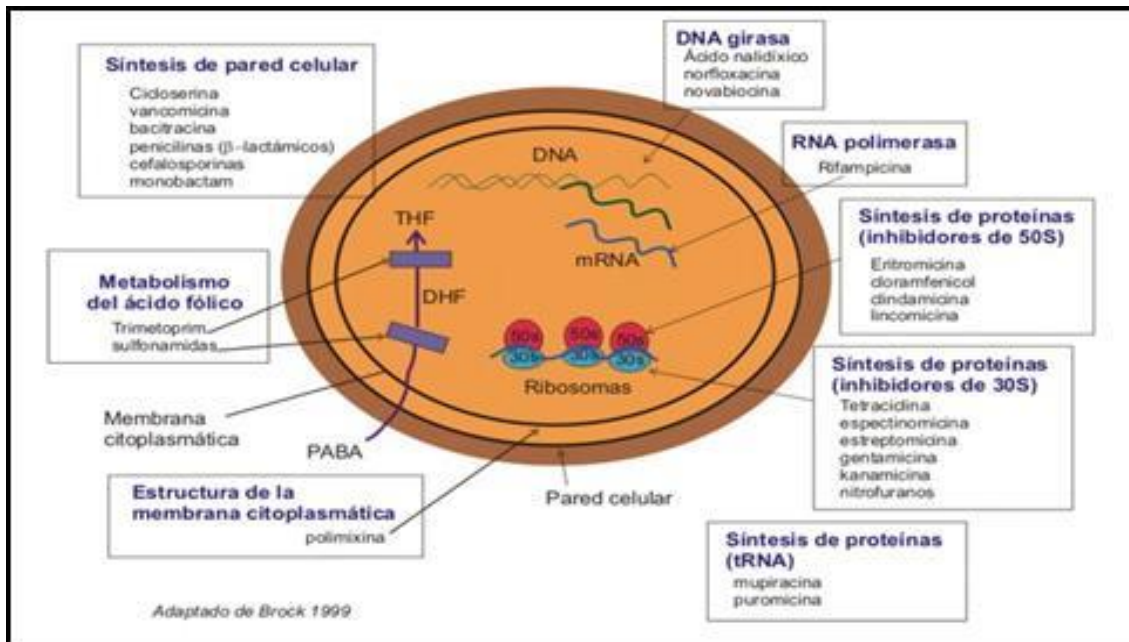


Fig 1. Mecanismo de acción de antibióticos.

Tomado de Revista de la Facultad de Medicina UNAM 2011.

2.3 Clasificación de Antibióticos β -lactámicos

Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular

Dentro de esta amplia gama de sustancias químicas se encuentran los antibióticos β -lactámicos, que desde su introducción en la terapéutica hace ya más de 70 años, representan los agentes antimicrobianos más ampliamente utilizados tanto a nivel nosocomial, como en la comunidad y en la veterinaria (Buynak, 2005). La característica común a todos los miembros de esta familia la determina la presencia de un anillo β -lactámico de cuatro átomos con un enlace amida en su estructura, al que se le unen sustituyentes o cadenas laterales.

En función de las características del anillo β -lactámico, estos antibióticos se clasifican en penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos. También se incluyen aquí por su estructura β -lactámica, los inhibidores de las betalactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) (Livermore, 1995).

Penicilinas

Las penicilinas fueron los primeros antibióticos de origen microbiológico usados en la terapéutica. Originalmente se obtuvieron de una mezcla de penicilinas conocidas

como F, G, K y X de cultivos de *Penicillium notatum*. Son un grupo de antibióticos de origen natural y semisintético que tienen un núcleo base común que es el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) gracias al cual compite con el sustrato natural de las enzimas PBPs (penicillin-binding proteins). Son bactericidas ya que inhiben selectivamente diferentes pasos de la síntesis del peptidoglicano (mureína), sustancia que le confiere la forma, rigidez y estabilidad a la membrana celular de casi todas las bacterias de importancia médica, excepto los Mycoplasmas (Valdés *et al.*, 1998). Se clasifican en dos grupos, naturales y semisintéticas (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de las penicilinas

Clasificación	Penicilinas
Penicilinas Naturales	Penicilina G, Penicilina G cristalina, Penicilina G Benzatínica, Penicilina G procaina, Penicilina V
Penicilinas Sintéticas Espectro medio	Aminopenicilinas: Ampicilina, amoxicilina, bacampicilina
Penicilinas de amplio espectro	Carboxipenicilinas: carbenicilina, ticarciclina. Ureidopenicilinas: Mezlocilina, azlocilina, piperacilina
Penicilinas asociadas a inhibidores de betalactamasas	Amoxicicilina-sulbactam Amoxicilina- ácido clavulánico Amoxicilina-sulbactam Ticarciclina-ácido clavulánico Piperazilina-Tazobactam

Tomado de Vignoli, 2011.

Cefalosporinas

Las cefalosporinas o cefems son antibióticos semisintéticos derivados de la cefalosporina C, un antibiótico natural producido del hongo *Cephalosporium acremonium*. Son de amplio espectro y bactericidas ya que inhiben la síntesis de la pared bacteriana al igual que las penicilinas y se clasifican por generaciones, en base a la similitud de sus actividades antibacterianas y de cuando fueron introducidas en el mercado. Las más modernas han ido incrementando su actividad

contra las bacterias Gram negativas. Se clasifica en cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación (Cué *et al.*, 1998).

Tabla 3. Clasificación de las cefalosporinas

Generación	Cefalosporina
Primera	Cefazolina, cefalotina, cefaloridina, cefaprina, cefadroxil, cefalexina, cefradina, cefatrizina.
Segunda	Cefuroxima, cefamandol, cefonicid, ceforamida, Moxalactan, Cefuroxima, Cefotiam, Cefamicinas: <ul style="list-style-type: none"> • Cefoxitina • Cefmetazol • Cefminox • Ceftetan • Cefbuperazona
Tercera	Cefotaxima, ceftazidime, ceftoxime, cefoperazona, ceftriaxona, cefpirome, cefixime, cefetamet, proxetil, cefpodoxima, ceftibuten, cefdinir, cefmenoxima, cefsulodina.
Cuarta	Cefepime, cefaclidina, cefeselis, cefelidina.

Tomado de Cué, 1998.

Carbapenémicos

Son una clase única de antibióticos betalactámicos que presentan el mayor espectro de actividad conocido en antibióticos de este grupo. Muestran una elevada afinidad por las diferentes enzimas que participan en el ensamblaje del peptidoglucano, estructura esencial en la pared celular de las bacterias. Se conoce que en bacterias Gram negativas los carbapenémicos muestran una elevada afinidad por (Proteínas de unión a Penicilina) PBPs de alto peso molecular y la diferencia de esta afinidad es

lo que determina la capacidad antimicrobiana de cada carbapenémico. Son capaces de inhibir la síntesis de la pared celular durante la transpeptidación, ya que al unirse a residuos de serina que forman parte de las PBPs impiden que la pared bacteriana se ensamble adecuadamente dando como resultado el debilitamiento de ésta y en última instancia la lisis de la célula bacteriana. Imipenem es el único betalactámico que presentan un efecto conocido como "efecto post antibiótico" (descrito por primera vez en los aminoglucósidos). Consiste en la persistencia de un efecto bacteriostático sobre una población bacteriana luego de una corta exposición a concentraciones bactericidas del antibiótico (Quintana *et al.*, 2006).

Monobactámicos

Derivado del *Chromobacterium violaceum* es el aztreonam, un betalactámico monocíclico incluido en el arsenal terapéutico en la década del 80, su actividad se asemeja a la de los aminoglucósidos y es muy activo frente al *Gonococo* y el *H. influenzae*. Es un fármaco bien tolerado, no existe reacción cruzada en sujetos alérgicos a las penicilinas y cefalosporinas. La mayoría de los gérmenes grampositivos y anaerobios son resistentes al aztreonam. Los monobactámicos interfieren en la síntesis de la pared bacteriana, tanto de gramnegativos como de grampositivos, aunque con menos efectos en estos últimos, son bactericidas. (Arias *et al.*, 1998).

Inhibidores de betalactamasas

Las betalactamasas son enzimas producidas por algunas especies bacterianas y son las responsables de la resistencia que presentan dichas bacterias hacia antibióticos que en su estructura química presentan el anillo betalactámico (como penicilinas y cefalosporinas), ya que las betalactamasas rompen ese anillo con lo cual bloquean la actividad antimicrobiana de esos compuestos. Las sustancias inhibitoras de las betalactamasas son el ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam.

2.4 RESISTENCIA BACTERIANA

El surgimiento de bacterias resistentes a los antibióticos es uno de los principales problemas de salud pública. Esto es debido a que las bacterias han desarrollado múltiples mecanismos bioquímicos para contender a la acción de las diferentes clases de antibióticos. Algunas de ellas poseen la capacidad de resistir a la acción de más de un antibiótico que pertenece a familias diferentes por más de un mecanismo de resistencia. El problema se agrava con la aparición de bacterias de importancia clínica multirresistentes a los antibióticos principalmente a los de primera elección, lo cual provoca una disminución en las opciones de tratamientos en contra de las

enfermedades infecciosas producidas por estos microorganismos (Rocha- Gracia *et al.*, 2009).

La resistencia bacteriana puede ser de dos tipos; la resistencia intrínseca y la resistencia adquirida.

La resistencia intrínseca es aquella que se desarrolla en forma natural en ausencia de mecanismo de presión de selección antimicrobiana (no hay exposición previa a antibióticos); esto implica que no todas las especies bacterianas son susceptibles naturalmente a los antimicrobianos.

En bacterias Gram negativas la membrana externa funciona como una barrera de permeabilidad limitando el acceso de agentes antibacterianos. Presenta una resistencia intrínseca independiente de mutaciones o resistencia adquirida.

Las bombas de expulsión están presentes en la superficie bacteriana de células procariotes. Acomodan y expulsan una gran variedad de sustancias estructuralmente no relacionadas: biocidas, colorantes, detergentes (incluyendo sales biliares), ácidos grasos, solventes orgánicos, homoserin-lactonas y antibióticos (Rocha- Gracia *et al.*, 2009).

La resistencia adquirida es importante desde un punto de vista clínico debido a la modificación de la carga genética de la bacteria y puede aparecer por mutación cromosómica o por adquisición de mecanismos de transferencia genética. La primera puede ir seguida de la selección de las mutantes resistentes (rifampicina, macrólidos), mientras que la resistencia transmisible está mediada por plásmidos, transposones o integrones, que pueden pasar de una bacteria a otra. Las bacterias se hacen resistentes a los antibióticos desarrollando mecanismos de resistencia que impiden al antibiótico ejercer su mecanismo de acción (Alpuche, 2002).

Los mecanismos de resistencia de las bacterias son fundamentalmente tres:

1) Inactivación del antibiótico por enzimas:

Las bacterias pueden producir enzimas que destruyen o modifican la estructura química de un antibiótico, inactivándolo. La destrucción del antibiótico se lleva a cabo por hidrólisis y las modificaciones incluyen: acetilación, adenilación, fosforilación, ADP ribosilación, glicosilación y adición del grupo azufre. Entre otros se encuentra también la modificación redox y la acción de liasas.

2) Modificación del sitio blanco

a) Los antibióticos β -lactámicos actúan sobre las proteínas de la pared celular PBPS (unidoras de penicilina) Las mutaciones en estas proteínas, tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas, disminuyen la

afinidad por los antibióticos β -lactámicos, permitiendo la formación de la pared celular.

b) Modificación de ribosomas. Puede involucrar componentes de las subunidades 50S, 30S o al RNA ribosomal 23S o 16S. Este mecanismo de resistencia se ha descrito para tetraciclina y macrólidos. Los responsables de la resistencia bacteriana a tetraciclina son proteínas producidas por las bacterias resistentes, que tienen homología a factores de elongación. Estos factores también tienen actividad de GTPasa y funcionan facilitando la eliminación de tetraciclina del ribosoma en una vía dependiente de energía (Connell., 2003). La modificación postranscripcional del rRNA 23S por metilación de adenina está asociada con la resistencia a eritromicina, lincomicina y clindamicina y causa un decremento en la afinidad de los antibióticos a sus blancos en el ribosoma.

c) Alteraciones en la DNA-girasa (enzima que cataliza el superenrollamiento del ADN cromosómico previo a la división celular) median la resistencia a las quinolonas. Esta enzima está codificada por dos genes *gyrA* y *gyrB*. La mutación de una de ellas es suficiente para la aparición de resistencia. Este mecanismo de resistencia ha sido descrito en aislamientos de Enterobacterias, incluyendo *E. coli*, y en especies de Gram positivos como *Staphylococcus aureus*.

3) Mecanismo de expulsión y reducción de la permeabilidad celular hacia antibióticos.

Las bombas de eflujo han sido reconocidas por muchos años y están presentes en células procariotes. Su popularidad ha venido en aumento con la creciente evidencia que las implica como responsables de resistencia contra antimicrobianos. Se encuentran en la membrana externa de la célula y expulsan hacia el exterior de la bacteria gran cantidad de moléculas, entre ellas, metabolitos, detergentes, solventes orgánicos y antibióticos. Estas bombas operan tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior, con lo cual evita que llega a su sitio de acción. Este mecanismo es frecuentemente utilizado por bacterias Gram negativas; para ello, utilizan la hidrólisis de ATP o un mecanismo de contra-transporte iónico como sustrato energético. El principal papel de este mecanismo es mantener bajas las concentraciones de sustancias tóxicas dentro de la célula.

Las bombas de eflujo pueden ser específicas para un fármaco (generalmente, codificadas en plásmido y, por lo tanto, transmisibles) o inespecíficas (generalmente expresadas en el cromosoma bacteriano) (Tafur *et al.*, 2008).

En la siguiente Tabla (Tabla 4) se muestran los mecanismos de acción y resistencia de las diferentes familias de antibióticos (Mosquito *et al.*, 2011).

Tabla 4. Mecanismo de acción y resistencia de las familias de antibióticos.

Familia de antibióticos	Mecanismo de acción	Mecanismo de resistencia
Betalactámicos	Interfiere en las últimas fases de la síntesis de peptidoglicano, componente necesario para la formación de la pared bacteriana	Betalactamasas: enzimas que se caracterizan por hidrolizar el enlace amida del núcleo betalactámico, inactivando el antibiótico
Quinolonas	Inhibe la acción de las topoisomerasas y de la DNA girasa bacteriana	Sistemas de expulsión y presencia de genes plasmídicos de resistencia antibiótica
Tetraciclinas	Se unen al ribosoma bacteriano en la unidad 30S inhibiendo la síntesis de proteínas	Presencia de bombas de eflujo específicas para tetraciclinas
Cloranfenicol	Inhibidor de la biosíntesis de proteínas, previene la elongación de la cadena de péptidos tras unirse al centro de la peptidiltransferasa del ribosoma 70S	Inhibición enzimática por acetilación y exportadores específicos de cloranfenicol
Trimetoprim/ Sulfametoxazol	Inhibe la síntesis de la enzima dihidropteroato sintasa (sulfametoxazol) y de la enzima dihidrofolato reductasa (Trimetoprim) enzimas necesarias en la ruta del ácido fólico	Presencia de genes que codifican formas mutantes de la enzima blanco

Tomado de Mosquito *et al.*, 2011.

2.5 Betalactamasas de Espectro Extendido

Las betalactamasas de espectro extendido BLEE son enzimas que fenotípicamente se caracterizan por conferir resistencia a penicilinas y cefalosporinas, incluyendo a las de tercera y cuarta generación e incluso carbapenémicos; y pueden ser inhibidas por el ácido clavulánico u otros inhibidores de betalactamasas como el tazobactam y el sulbactam (Knothe *et al.*, 1983). Estas enzimas se han descrito en cepas de *E. coli* aisladas tanto de animales como en humanos y las más comunes son las del tipo CTX-M, SHV y TEM.

Las β -lactamasas generalmente son clasificadas de acuerdo a dos esquemas: el de Ambler y el de Bush-Jacoby-Madeiros. La clasificación de Ambler posee cuatro tipos A, B, C, D, y está basada en la similitud u homología de los aminoácidos y no tiene en cuenta las características fenotípicas. En esta clasificación la clase B son metalo- β -lactamasas y el resto serino β -lactamasas. La clasificación de Bush-Jacoby-Madeiros se basa en la similitud funcional y la característica de inhibición o no por el ácido clavulánico (Rocha- Gracia *et al.*, 2009).

Existen otras β -lactamasas comunes en algunos hospitales pero que no son consideradas estrictamente BLEE, se denominan β -lactamasas AmpC (grupo 1 Bush-Jacoby-Madeiros). Estas enzimas cromosómicas confieren resistencia a la ampicilina, amoxicilina, aztreonam y a la mayoría de las cefalosporinas, principalmente cefoxitina. También existen algunas variedades que son transferidas por plásmidos, las (CMY). Estas enzimas se diferencian de las BLEE porque son resistentes a los inhibidores de β -lactamasas y susceptibles a las cefalosporinas de cuarta generación. Con base a estos perfiles de susceptibilidad es importante distinguir entre un microorganismo productor de AmpC y otro de BLEE, ya que sus implicaciones terapéuticas son diferentes (Maattar *et al.*, 2007).

El incremento de aislados bacterianos productores de BLEE (como la CTMX-15) asociados con genes codificantes para resistencia a quinolonas, aminoglucósidos y demás antibióticos utilizados en la clínica, se ha relacionado a procesos de co-selección mediante la presencia de estos genes en diferentes plataformas genéticas de transferencia horizontal como secuencias de inserción, transposones, integrones y plásmidos (Maattar *et al.*, 2007).

Bla TEM

La primera β -lactamasa mediada por plásmidos fue descrita en 1965 en Grecia en un aislado de *E. coli* de una paciente llamada Temoniera y se denominó TEM-1 y se diseminó rápidamente a otros miembros de las enterobacterias y bacterias oxidantes (Maattar *et al.*, 2007).

Cerca del 90% de la resistencia a ampicilina en *E. coli* es debido a la producción de TEM-1 (Livermore, 1995). A la fecha se han descrito 196 variantes de esta enzima (www.lahey.org/studies, 2011). Las combinaciones de estos cambios en aminoácidos resultan en la alteración de fenotipos BLEE, tales como la capacidad de hidrolizar de forma específica oximiino-cefalosporinas como ceftazidima y cefotaxima. (Cortés-Cortés *et al.*, 2012).

Bla SHV

La primera de estas enzimas BLEE mediadas por plásmidos fue SHV- 2 descrita en Alemania en 1983 a partir de un aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* capaz de hidrolizar las oxymino-cefalosporinas (ceftazidima, cefpodoxima, ceftriaxona, cefotaxima) y aztreonam (Maattar *et al.*, 2007).

La β -lactamasa SHV-1 es responsable de un poco más del 20% de la resistencia a ampicilina mediada por plásmidos en esta especie (Tzouveleakis *et al.*, 1999). En varias cepas de *K. pneumoniae*, el gene blaSHV-1 o genes relacionados están integrados al cromosoma bacteriano (Livermore, 1995). Se ha hipotetizado que en este gen codificante a SHV-1 puede existir caracterización de resistencia a β -lactámicos y quinolonas como parte de un elemento transponible, aunque esto nunca ha sido probado (Jacoby, 1991). Contrario a las β -lactamasas tipo TEM, existen pocos derivados de SHV-1. Sin embargo, los cambios que han sido observados en el gen blaSHV y que dan un aumento en las variantes de SHV, se han observado en pocas posiciones dentro del gen estructural. A la fecha, la mayoría de los derivados de β -lactamasas tipo SHV poseen el fenotipo BLEE. (Cortés-Cortés *et al.*, 2012).

Bla CTX-M

Se describió una nueva familia de β -lactamasas mediada por plásmidos llamada CTX-M, que hidrolizan preferencialmente cefotaxima. Las enzimas tipo CTX-M se dividen según su secuencia de aminoácidos en cinco grupos (Tabla 5).

Tabla 5. Clasificación de CTX-M (Cantón *et al.*, 2006).

GRUPO	VARIANTES
1	(CTX-M-1, -3, -10, -11, -12, -15, -23, -28)
2	(CTX-M-2, -4, -5, -6, -7, -20, Toho-1)
3	CTX-M-8
4	(CTX-M-9, 13, -14, -16, -17, -18, -19, -21, Toho-2)
5	CTX-M-25

Tomado de Cantón *et al.*, 2006

Tienen una gran actividad hidrolítica frente a cefotaxima y algunas de sus variantes también a ceftazidima, pero son inhibidas por el tazobactam y el ácido clavulánico. Estas enzimas no están relacionadas muy cercanamente con las β -lactamasas TEM y SHV, sólo comparten un 40% de identidad (Bonomo, 1999), lo que indica que probablemente no tienen un origen a partir de estas enzimas. Sin embargo, se ha propuesto que las BLEE de tipo CTX-M derivan de β -lactamasas cromosómicas de distintas especies de *Kluyvera*. En 1986, se describió en Japón una cepa de *E. coli* resistente a cefotaxima procedente de las heces de un perro, en la que se caracterizó la β -lactamasa FEC-1 (Matsumoto, 1988). Posteriormente, en 1989, se describió en Alemania una cepa de *E. coli* con un fenotipo similar a FEC-1 que producía una BLEE y se designó como CTX-M-1, que debe su nombre a la elevada actividad hidrolítica hacia la cefotaxima y a que el primer aislado se obtuvo en la ciudad de Munich (Cefotaximasa aislada en Mucnich), (Bauernfeind, 1990). Simultáneamente en Argentina se describió la enzima CTX-M-2 en cepas de *Salmonella typhimurium* (Bauernfeind *et al.*, 1992). Las CTX-M constituyen un nuevo grupo de β -lactamasas de la clase A de Ambler con propiedades de espectro extendido. Las enterobacterias productoras de CTX-M son endémicas en América Latina y en algunas áreas del noreste de Europa. Como en las otras BLEE, son los cambios aminoacídicos los que originan las diferentes variantes de esta enzima. El residuo serina en la posición 237, el cual está presente en todas las enzimas CTX-M, juega un papel importante en la actividad de espectro extendido de las β -lactamasas tipo CTX-M (Tzouvelekis *et al.*, 2000). La enzima BLEE CTX-M-15 actualmente se encuentra considerada como un marcador epidemiológico de multirresistencia a nivel mundial, ya que su diseminación está ligada a una co-selección tras la presencia de genes de resistencia a otros antibióticos como aminoglucósidos y quinolonas, que pueden estar localizados en plásmidos y ser transferidos de forma horizontal en elementos móviles como transposones e integrones, originando una rápida propagación de la resistencia a β -lactámicos, quinolonas, aminoglucósidos y otros antibióticos (Cortes-Cortes *et al.*, 2012).

3. ANTECEDENTES

Las mascotas son reservorios de diferentes especies de bacterias que albergan genes de resistencia de importancia clínica en humanos.

En Reino Unido se reportó un aumento de resistencia en *E. coli* a amoxicilina con ácido clavulánico y estreptomina, en muestras clínicas de hospitales veterinarios. (Normand *et al.*, 2000). De igual forma, se reportó el hallazgo de muestras de *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido aislada de muestras clínicas, tomadas del recto de perros hospitalizados en Corea (Kang *et al.*, 2002).

Por otro lado, se ha reportado también que cepas de *E. coli* aisladas de mascotas en 2002 en Dinamarca presentaban un alto índice de resistencia a penicilinas, así como también un pequeño porcentaje a eritromicina, sulfanomidias y trimetoprim. (Guardabassi *et al.*, 2004). Mientras que, en Polonia, en estudio realizado en perros enfermos y hospitalizados se encontraron en 3 diferentes filogrupos según Ambler (A, B1 Y D) (Rzewuska *et al.*, 2011).

En Corea del Sur, un estudio de 628 muestras intestinales de perros callejeros obtuvo un total de 12 y 23 muestras positivas para *E. coli* productoras de BLEE y AmpC respectivamente (Tamang *et al.*, 2012).

En América latina se reportó un estudio en Brasil en el cual se recolectaron 50 muestras de gatos y 50 de perros y se observó una alta presencia de serotipos de *E. coli* como EPEC y EAEC, así como también resistencia a β -lactámicos, tetraciclina y sulfanomidias (Puño-Sarmiento *et al.*, 2013).

Mientras que en un estudio realizado con 200 muestras de humanos y 313 muestras de animales de compañía en Alemania se encontró que las muestras de humanos presentaban resistencia a ceftazidima, cefotaxima y cefepime; En las muestras de animales se encontró resistencia a ceftazidima, cefotaxima y cefepime, así como también a algunos carbapenems como imipenem. Se buscó si existía correlación entre las muestras mediante la obtención de genes de resistencia de las muestras obtenidas (Schmiedel *et al.*, 2014).

En Berlín, se identificaron muestras fecales de caninos resistentes a cefotaxima, de las cuales el 10% eran fenotipo BLEE y el 4% fenotipo AmpC (Schaufler *et al.*, 2015). Se comprobó la resistencia a antibióticos tales como ampicilina, ácido clavulánico, gentamicina, kanamicina, doxiciclina, cloranfenicol y ácido nalidíxico. Este estudio sugirió la importancia de la resistencia a antibióticos en caninos, los cuales podrían contribuir a la propagación de bacterias productoras de BLEE/AmpC hacia humanos (Schaufler *et al.*, 2015).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hay un incremento de cepas multidrogo-resistentes presentes en animales de compañía que están en contacto directo con humanos, que pueden funcionar como reservorios y ser potenciales transmisores a la comunidad o viceversa, generando cepas con mayor capacidad de resistencia.

5. JUSTIFICACIÓN

La presencia de bacterias resistentes a antibióticos β -lactámicos es un problema de la comunidad y de salud pública que va en aumento, es de suma importancia principalmente si se presentan cepas bacterianas en mascotas sanas que puedan funcionar como reservorios de bacterias multirresistentes y puedan transmitirlos a los humanos con los que conviven frecuentemente o viceversa, ocasionando una combinación de información genética de cepas de origen animal y humanas generando mutaciones en las bacterias que les permitan obtener más características de resistencia y/o virulencia.

Por lo anterior, la Organización Mundial de la Salud, recomienda desarrollar trabajos sobre la identificación de cepas multirresistentes y estudiar los mecanismos moleculares por medio de los cuales estas bacterias pueden resistir a los tratamientos, con la finalidad de aportar datos al personal médico para que conozcan la distribución de este fenómeno no solo a nivel mundial, sino también a nivel local y poder establecer estrategias de contención.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

- Estudiar la resistencia a antibióticos β -lactámicos en cepas de *Escherichia coli* aisladas de muestras de heces provenientes de mascotas y sus dueños y buscar si existe relación de multiresistencia entre las bacterias mediante la identificación de genes de resistencia.

6.2 Objetivos particulares

- Aislar e identificar cepas de *E. coli* presuntamente resistentes a CTX, a partir de muestras de heces de mascotas y sus dueños.
- Determinar la susceptibilidad antimicrobiana a las cepas aisladas e identificadas.
- Determinar el fenotipo de producción de β -Lactamasa de Espectro Extendido (BLEE) en las cepas de *E. coli*.
- Identificar genes que codifican para las BLEE tipo CTX-M grupo 1, TEM y SHV en los aislamientos de *E. coli*, mediante PCR y secuenciación.

7. HIPOTESIS CIENTÍFICA

- Existe una relación genética entre cepas provenientes de mascotas (Perros) y sus dueños, compartiendo material genético el cual le confiere la capacidad de multidrogo-resistencia.

8. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

8.1 Diseño del estudio

Se realizó un análisis de forma observacional de las características fenotípicas y genotípicas de las cepas identificadas como *E. coli* aisladas de muestras de heces obtenidas de mascotas y dueños sanos que asistieron a consulta al hospital de pequeñas especies de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, durante el período de Agosto del 2017 a Febrero de 2018. Los resultados obtenidos se relacionaron a través de los resultados fenotípicos y genotípicos de las pruebas ensayadas y con herramientas bioinformáticas.

8.2 Ubicación Espacio Temporal

La tesis se realizó en el Laboratorio de microbiología hospitalaria y de la Comunidad perteneciente al área de Microbiología Médica del Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

8.3 MUESTREO

Para la realización del muestreo, se revisaron los criterios de inclusión y exclusión, una vez elegidos los animales y sus dueños se procedió a realizar la toma de muestra. Para obtener la muestra de los perros se tomó un hisopado rectal con mucho cuidado y tratando de mantener en lo posible la muestra en condiciones de esterilidad y evitando su contaminación ambiental; el hisopo se colocó en un tubo con medio de transporte Stuart para su posterior procesamiento en el laboratorio.

Para la obtención de la muestra de los dueños, se les entregó un kit el cual constaba de un hisopo estéril y un tubo con medio de transporte Stuart para que en su hogar realizaran la toma de muestra directa de heces fecales y dentro de las siguientes 24 horas entregaran sus muestras para ser procesadas en el laboratorio.

8.3.1. Definición de la población

- Participaron una población de 50 humanos de una edad de 20-65 años y de ambos sexos.
- Participaron 50 perros de todas las razas, edades y sexo

8.3.2. Selección de la muestra

- Se seleccionaron las muestras provenientes de la ciudad de Puebla, Puebla tomadas del hospital de pequeñas especies.
- Se seleccionaron las muestras de los perros que llegaron a consulta al hospital y a sus dueños.
- Se utilizaron muestras de heces fecales por toma rectal de los perros.
- Heces fecales de humanos frescas (No más de 24 horas).

8.3.3 Criterios de Selección de las unidades de muestreo

Criterios de inclusión

- En este estudio participaron todos los perros sanos que llegaron al hospital de pequeñas especies durante el período de agosto del 2017 a febrero de 2018.
- Perros sanos, que solo los llevaran a su baño.
- Perros que presentaran infecciones cutáneas o respiratorias sin previa toma de antibióticos.
- Perros que los llevaran a consulta para aplicación de vacunas.
- Perros que presentaran fracturas o luxaciones.
- Los humanos participantes debían estar en contacto directo y frecuente con su mascota.
- Todos los dueños de perros que entregaron por escrito el consentimiento informado aceptado y debidamente firmado con el permiso de toma de muestra propia y de su mascota.

Criterios de exclusión

- Perros que presentaron infecciones gastrointestinales.
- Perros que cursaron con tratamiento con antibióticos.
- Personas que presentaron infecciones gastrointestinales.
- Personas que cursaron con tratamiento con antibióticos.
- Personas que no otorgaron su consentimiento para toma y procesamiento de las muestras.

Criterios de eliminación

- Muestras tomadas de perros con tratamiento con antibióticos.
- Muestras tomadas de personas con tratamiento con antibióticos.
- Muestras sembradas en medio McConkey con CTX y que no crecieran en el medio (no resistentes a CTX).

8.4 Diseño y tipo de muestreo

Muestreo observacional, sin importar edad y sexo en el caso de los humanos y en el caso de los perros sin importar raza, edad y sexo.

8.5 Tamaño de la muestra

Se obtuvieron un total de 100 muestras, de las cuales 66 provenientes de mascotas y 34 de humanos.

8.6 Definición de las variables y escala de medición

Personas: Estado de salud de la persona, no estar cursando con enfermedad gastrointestinal ni con tratamiento antibiótico; fecha de toma de muestra y procesamiento correcto de la muestra fecal.

Mascota: Estado de salud del perro, no cursar con enfermedad gastrointestinal ni tratamiento antibiótico; fecha de toma de muestra y pureza de la muestra.

Microbiológicas: Perfiles de sensibilidad a 17 antibióticos. La medición se basó en los criterios del CLSI 2018 catalogando a las cepas como: Resistentes, de Resistencia Intermedia y Sensibles. Identificación de genes de resistencia mediante PCR y secuenciación.

8.7 Método y recolección de datos

Las características fenotípicas de las cepas de *E. coli* fueron determinadas por pruebas bioquímicas realizadas en el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad. La información de susceptibilidad antimicrobiana se determinó por el método de Kirby Bauer siguiendo los lineamientos del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018).

La detección de genes de resistencia se realizó por PCR individual siguiendo los protocolos previamente establecidos en el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad del CICM, revelándose por electroforesis en gel de agarosa.

Las secuencias de los genes de resistencia, fueron analizadas por el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) del Cinvestav.

8.8 Recursos humanos

Alumnos: Flor Yazmin Abad Bolaños, René Antonio Cuevas Bravo. Profesores: D.C Rosa del Carmen Rocha Gracia, MC. Edwin Barrios Lima y Dr. Rafael Erazo Montes Ramírez.

8.9 Recursos materiales

- Medio de transporte Stuart ® MCD Lab.
- Medio de cultivo Mc conkey ® Bioxon.
- Medio de cultivo TSA ® Bioxon.
- Medio de cultivo Muller Hinton ® Bioxon.
- Medio de cultivo TSI ® Bioxon.
- Medio de cultivo Citrato de Simmons ® Bioxon.
- Medio de cultivo Urea ® Bioxon.
- Medio de cultivo Rojo de metilo/ Vogues proskauer ® Bioxon.
- Medio de cultivo LIA ® Bioxon.
- Medio de cultivo MIO ® Bioxon.
- Sensidiscos con antibióticos

8.10 Recursos financieros

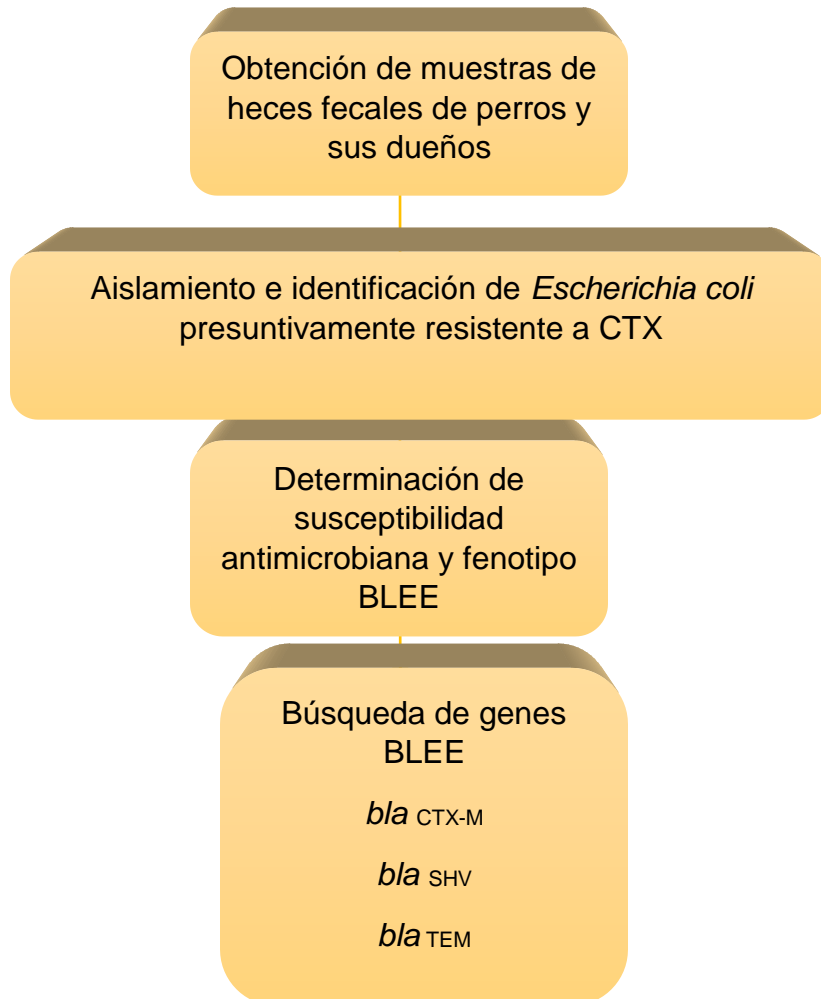
Este trabajo fue financiado por el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad, del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la BUAP. También fue financiado por el proyecto VIEP 100182644-VIEP2018.

8.11 Bioética

Las muestras fueron obtenidas con la autorización otorgada de los dueños mediante consentimiento informado para la toma de sus muestras y las de sus mascotas.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 Estrategia de Trabajo



9.2 Identificación de *Escherichia coli* en muestras de heces fecales.

Las cepas que se utilizaron en este trabajo procedieron de muestras de heces fecales de Perros y sus dueños, que acudieron a consulta con su mascota al hospital de pequeñas especies de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla de la ciudad de Puebla, Pue; las cepas fueron aisladas en el Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, que fueron obtenidas de individuos y sus mascotas, recolectadas durante el periodo de Agosto 2017 – Febrero 2018.

Las cepas se registraron con un número consecutivo en el cepario interno del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad-CICM, anotando los datos de la cepa; posteriormente se sembraron por estría cruzada en placas de agar Mc Conckey suplementado con CTX a una concentración de 2 µg/mL y se incubarán a 37 °C por 24 horas.

Las cepas con crecimiento en agar McConkey/CTX, se resembraron de forma masiva en placas de agar TSA (Bioxon ®), después de incubarlas 24 horas a 37 °C, se recolectó todo el crecimiento y se resuspendió en viales de 1 mL con caldo BHI (Bioxon ®) adicionado con glicerol (Bio-Rad ®) al 10% (vol/vol) y por último se guardaron a -70 °C para su posterior estudio. Las muestras que no presentaron crecimiento en el agar McConkey/CTX fueron desechadas.

La identificación de las cepas se realizó mediante pruebas bioquímicas con las indicaciones del método de Cowan y Steel (Barrow, 2004), específicas para Enterobacterias: Agar Hierro Lisina (LIA), Movilidad Indol Ornitina (MIO), Agar Hiero Triple Azúcar (TSI), Citrato (CIT), Fenilalanina (FEN), Rojo de Metilo-Voges Proskauer (MRVP), Agar Oxidación/Fermentación Entérica con glucosa (OF) y Urea de Christensen (URE). Los resultados se compararon con los esquemas de identificación señalados por Cowan y Steel en el manual de Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica de MacFaddin (MacFaddin, 2003), utilizando la clasificación taxonómica propuesta en la 2° edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Brenner et al., 2005).

9.3 Determinación del perfil de resistencia

Para realizar el perfil de resistencia se ensayaron 17 antibacterianos pertenecientes a las familias de antibióticos β-lactámicos, quinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas y otros (Tabla 6).

Se realizó mediante el método Kirby-Baüer, que comprende un antibiograma, empleado para determinar la sensibilidad de un microorganismo frente a un antibiótico determinado.

- Procedimiento

De un cultivo de 18 a 24 horas en agar TSA, se seleccionaron entre 3 y 5 colonias (se eligieron colonias bien aisladas para evitar pruebas de cultivo mixto), se recogieron de la placa con un asa bacteriológica y se colocaron en un tubo con 5 mL de Solución Salina Isotónica (SSI) (al 0.85% (masa/volumen) de NaCl), agitando para resuspender el inóculo. Posteriormente se ajustó la turbidez de la suspensión bacteriana con un estándar, de tal manera que alcanzara un valor de 0.5 de la escala de McFarland, que equivale a 1.5×10^8 UFC/mL. Después se impregno un hisopo de algodón estéril con la suspensión y se inocularon placas de agar Müller Hinton (Bioxon®), empezando en la parte superior de la placa deslizando el hisopo sobre la superficie del agar tres veces, rotando la placa unos 60° cada vez y pasándolo por último sobre la periferia del agar para conseguir una siembra uniforme, de tal manera que el crecimiento fuera en forma de “césped bacteriano”.

Una vez inoculadas las placas se colocaron los sensibilizadores impregnados con los antibióticos (Bio-Rad®), esto se hizo con ayuda de una pinza estéril presionando ligeramente para asegurar el contacto con la superficie; se colocaron 7 discos por placa. Después de 15 minutos de haber colocado los discos, se invirtieron las placas y se incubaron a 37°C por un lapso de 18 a 24 horas. Finalmente se midieron los halos de inhibición y se compararon con los valores establecidos para Enterobacterias del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018), con los cuales se determinó si las cepas fueron sensibles, intermedias o resistentes a cada uno de los antibióticos. En caso de no haber halo de inhibición, se consideró un valor de 6 mm que corresponde al diámetro del sensibilizador (Figura 2).

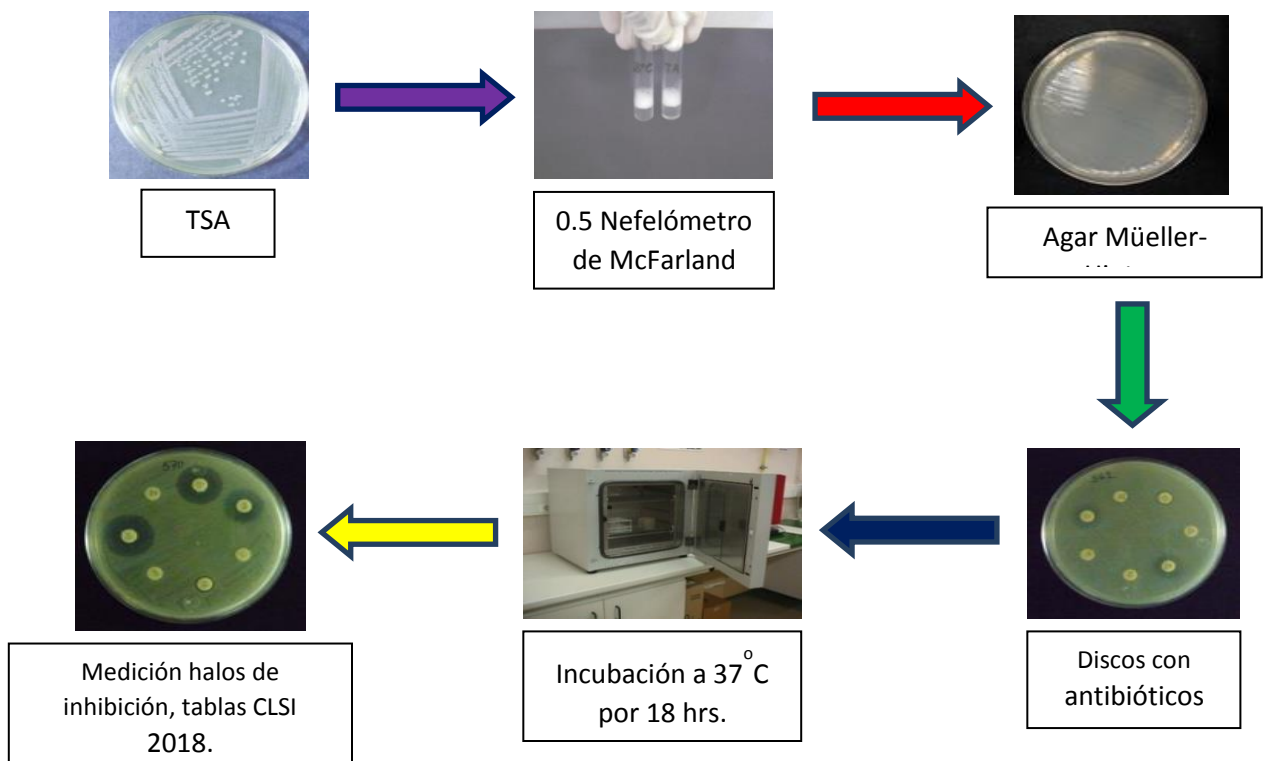


Figura 2. Esquema de trabajo para determinar el perfil de resistencia en las cepas de *Escherichia coli* aisladas de humanos y mascotas.

Tabla 6. Antibióticos, concentración y diámetro del halo de inhibición (en milímetros) utilizados en la determinación del perfil de resistencia a los 17 antibióticos.

Familia	Antibiótico		Concentración (µg)	R	I	S
β-lactámicos	Ampicilina	AMP	10	≤13	14-16	≥17
	Amoxicilina con Ácido Clavulánico	AMC	20/10	≤13	14-17	≥18
	Cefoxitina	FOX	30	≤14	15-17	≥18
	Ceftazidima	CAZ	30	≤17	18-20	≥21
	Cefotaxima	CTX	30	≤22	23-25	≥26
	Cefepime	FEP	30	≤18	-	≥25
	Aztreonam	ATM	30	≤17	18-20	≥21
	Imipenem	IPM	10	≤19	20-22	≥23
	Meropenem	MEM	10	≤19	20-22	≥23
Quinolonas	Ciprofloxacina	CIP	5	≤15	16-20	≥21
	Ácido Nalidíxico	NA	30	≤13	14-18	≥19
Aminoglucósidos	Estreptomina	S	10	≤11	12-14	≥15
	Gentamicina	GM	10	≤12	13-14	≥15
	Amikacina	AN	30	≤14	15-16	≥17
Tetraciclinas	Tetraciclina	TE	30	≤11	12-14	≥15
Otros	Trimetoprim con Sulfametoxazol	SXT	1.25/23.75	≤10	11-15	≥16
	Cloranfenicol	C	30	≤12	13-17	≥18

R: Resistente; I: Intermedio; S: Sensible.

Fuente: CLSI 2018

9.4 Producción de β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE)

La identificación fenotípica de las BLEE se realizó mediante la prueba de difusión con doble disco (Jarlier *et al.*, 1988), que se basa en el hecho de que las BLEE son inhibidas por el Ácido Clavulánico, Sulbactam y Tazobactam, por lo que al colocar un disco impregnado de un antibiótico β -lactámico a una distancia de 2 a 2.5 cm de otro impregnado con algún inhibidor, se produce un sinergismo entre el inhibidor de la β -lactamasa y el antibiótico, debido a que como la estructura del inhibidor es muy semejante a la del antibiótico, la β -lactamasa se une irreversiblemente al inhibidor, dejando así actuar al antibiótico sin que se hidrolice. La presencia de una BLEE se aprecia observando la formación de una “cola de pescado”, un “huevo” o simplemente una prolongación del halo de inhibición, entre el disco del inhibidor y el del antibiótico β -lactámico evaluado.

- Procedimiento

El método se realizó de la misma manera que un antibiograma convencional, es decir, de un cultivo de 18 a 24 horas en agar TSA, se seleccionaron entre 3 y 5 colonias y se resuspendieron en un tubo con 5 mL de SSI al 0.85% (masa/volumen) de NaCl. Posteriormente se ajustó la turbidez al tubo 0.5 de la escala de McFarland y se impregno un hisopo de algodón estéril con la suspensión para sembrar en placas de agar Müeller Hinton, empezando en la parte superior de la placa deslizando el hisopo sobre la superficie del agar tres veces, rotando la placa unos 60° cada vez y pasándolo por último sobre la periferia del agar para conseguir una siembra uniforme, en forma de “césped bacteriano”.

Después se colocaron los sensibilizadores de antibióticos, situando en el centro un disco de Amoxicilina/Ácido Clavulánico (concentración de 20/10 μ g) a una distancia de 2 cm de discos con carga estándar (30 μ g) de Cefotaxima, Ceftazidima, Cefepime y Aztreonam. 15 minutos después se invirtieron las placas y se incubaron de 18 a 24 horas a 37 °C. Finalmente se observó la presencia o no del sinergismo (Figura 3).

La prueba se realizó utilizando como control a la cepa *E. coli* C1550 (Rocha-Gracia *et al.*, 2010) que da un efecto positivo de sinergismo para los antibióticos Aztreonam, Cefotaxima y Ceftazidima.

Nota: Este método se aprovechó para medir los halos de inhibición de los antibióticos involucrados, mismos que no se incluyeron en la prueba de Kirby-Baüer.

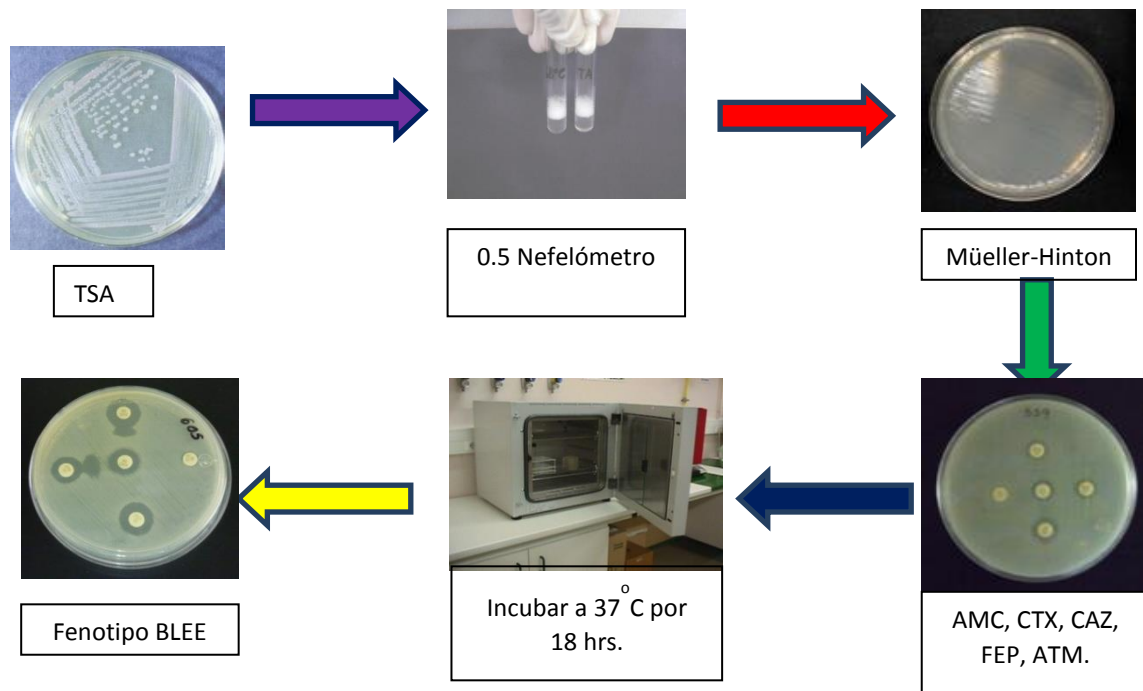


Figura 3. Esquema de trabajo para determinar el fenotipo BLEE en las cepas de *Escherichia coli* aisladas de humanos y mascotas. AMC: Amoxicilina/Ácido clavulánico; CTX: Cefotaxima; CAZ: Ceftazidima; FEP: Cefepime; ATM: Aztreonam.

9.5 Amplificación de genes BLEE

La reacción en cadena de la polimerasa, PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), es una técnica de biología molecular descrita en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA particular, partiendo de una sola copia.

Con ayuda de esta técnica se amplificaron los genes *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, y en las cepas que presentaron multirresistencia a los antibióticos β -lactámicos y que fueran positivas a la prueba fenotípica de producción de BLEE, para lo cual se utilizaron los oligonucleótidos reportados previamente (Cortés-Cortés *et al.*, 2017) específicos para cada uno de los genes.

9.6 Obtención del templado de DNA. (Extracción por el método de extracto hervido).

Esta técnica se basa en la ruptura celular mediante el proceso físico de la ebullición, permitiendo la salida del contenido celular que queda en suspensión.

Procedimiento

Para el caso de *E. coli* a partir de un cultivo puro en placa de agar TSA de 24 horas, se recogió una asada y se suspendió en 0.8 mL de SSI estéril, se mezcló con vórtex y se centrifugó a 13000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y a la pastilla se le agregaron 0.8 mL de agua inyectable estéril, se homogenizó con vórtex y se colocó durante 10 minutos en un baño con agua hirviendo. Después de agitar con vórtex durante 10 segundos y dejar enfriar a temperatura ambiente, se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se recogió en un tubo eppendorf estéril, se midió la concentración de DNA y se guardó a -20°C hasta su uso.

Para determinar la concentración y pureza del DNA obtenido se procedió a leer la absorbancia que presentó a 260 y 280 nm con el empleo del NanoDrop (programa NanoDrop 3.0.0). La lectura a 260 nm indicó la concentración de DNA teniendo en cuenta que 1 unidad de densidad óptica equivale a 50 µg/mL de DNA de doble hebra. Por otro lado, la pureza del DNA viene determinada por el cociente entre las absorbancias obtenidas a 260 y 280nm. Una preparación pura de DNA daría un cociente entre 1,8 y 2, por lo que si hay contaminación con proteínas o fenol el cociente es menor. Se consideró un rango aceptable entre los valores de 200 a 400 ng/µL de DNA para utilizar ese templado en las PCR.

Cabe mencionar que la PCR se realizó preparando una mezcla de reacción, la cual se llevó a cabo a un volumen final de 10 µL, la cual contenía 6.4 µL de agua, 1 µL de buffer, 1 µL de MgCl₂, 0.4 µL de DNTP'S, 0.1 µL de Taq, 0.5 µL de ADN y 0.3 µL de oligonucleótidos delantero y reverso respectivamente (Tabla 7).

Tabla 7. Preparación de la mezcla de reacción.

Material	Concentración inicial	Vol (µL)	Concentración final
Agua		6.4	
Buffer	10x	1	1 x
MgCl ₂	25mM	1	2.5 mM
DNTP's	10mM	0.4	0.4mM
Oligo F	25 µM	0.3	0.75 µM
Oligo R	25 µM	0.3	0.75 µM
Taq	5 U/µL	0.1	0.5 U
ADN	100ng/µL	0.5	5 ng/µL
Vol final		10	

Condiciones para las PCR

Los termocicladores a utilizar fueron el Thermal Cycler Techne modelo TC-412, T3, T3000 thermocycler (Biometra ®) y MULTIGENETM MINI, Labnet.

Las condiciones de reacción fueron las que se muestran en las tablas. En cada PCR se utilizaron dos controles: un control negativo que consistía de la misma mezcla de reacción, pero sin DNA, en su lugar se colocó el volumen correspondiente de agua libre de nucleasas; y como control positivo se utilizó el DNA proveniente del lisado bacteriano de alguna cepa con el gen de interés ya secuenciado.

Nom bre del gen	Nom bre del oligo nucle ótido	Tm Oligo nucle ótido	Concen tración inicial (µM)	Secuencia (5'-3')	Tama ño del ampli ficad o (pb)	Condicion es de reacción	Referen cia
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX M Unive rsal R	57.1	100	CGATGTGC AGTACCAG TAA	566	34° 5 MIN 1C 34°C 30 Seg 52°C 30 seg 35c	Batchel or <i>et.al</i> ; 2005
	CTX M Unive rsal F	62.8	100	TTAGTGAC CAGAATCA GCGG		72°C 1min 72°C 5min 1c	
<i>bla</i> _{CTX-M grupo 1}	CTX-M13U	51.4	100	GGTAAAAA ATCACTGC GYC	843	34°C 5 min 1c 34°C 50seg 50°C 40seg 35c	Briñas <i>et al</i> ; 2005
	CTX-M13D	56	100	TTGGTGAC GATTTTAG CCGC		68° 1c 68°C 5min 1c	

<i>bla_{SHV}</i>	SHV1-F	53.5	100	CACTCAAG CATGTATT GTG	883	96°C 15seg 1c	Pitout <i>et al</i> ; 1998
	SH2-R	67.5	100	TTAGCGTT GCCAGTG CTCG		96°C 15 seg 52°C 15 seg 24c 72°C 2min 72°C 3mi 1c	
<i>bla_{TEM}</i>	TEM-F	62.1	100	ATTCTTGA AGACGAAA GGGC	1029	34°C 3min 1c 34°C 1min	Belaou aj <i>et al</i> ; 1994
	TEM-R	64.1	100	ACGCTCAG TGGAACGA AAAC		60°C 1 min 30c 72°C 5 min 1c	

9.7 Visualización de los productos de PCR

Los productos de las PCR se corrieron en geles de agarosa al 1% en una cámara de electroforesis con TAE 1X, a 100 Voltios durante 35 minutos junto con un marcador de peso molecular O' Gene Ruler (Fermentans ®, de un rango de 100 a 3000 pb). Posteriormente los geles se tiñeron con Bromuro de Etidio (BET) 0.5 g/L durante 30 segundos y se lavaron en agua destilada por 1 minuto. Para visualizar los fragmentos de DNA, los geles se fotografiaron en un digitalizador de imágenes ChemiGenius (GenSnapfromSynGene).

9.8 Detección de genes de resistencia

La búsqueda de genes de resistencia se hizo mediante el establecimiento de cinco reacciones en cadena de polimerasa individuales (PCR) cada una de estas amplifica fragmentos específicos de diferente peso molecular. Los productos del PCR individual se corrieron en un gel de agarosa al 1% junto con un indicador de peso molecular de 100 pares de bases, el gel se tiñó con bromuro de etidio que actúa como marcador de DNA intercalándose entre sus bases nitrogenadas y emitiendo fluorescencia al ser excitado con luz ultravioleta. El gel teñido se colocó en el fotoDocumentador, el cual emite luz UV y nos permite obtener una fotografía de los amplificados de DNA en la agarosa.

Tabla 8. Tamaño de los amplificados esperados de los genes de resistencia

GEN	TAMAÑO PB
Bla_{TEM}	1029
Bla_{CTXM-U}	566
Bla_{CTXM-1}	876
Bla_{SHV}	883

10. RESULTADOS

Objetivo1. Aislar e identificar cepas de *E. coli* presuntivamente resistentes a CTX, a partir de muestras de heces de mascotas y sus dueños.

Aislamiento e identificación de cepas de *Escherichia coli*

Se obtuvieron un total de 100 muestras de heces fecales de perros y sus dueños del hospital de pequeñas especies de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla de la ciudad de Puebla, Pue, México; recolectadas durante el periodo de agosto 2017– febrero 2018. Del total de muestras, 66 provinieron de perros y 34 de humanos (dueños). Las muestras se sembraron en agar McConkey adicionado con CTX (2µg/mL) y se tomó un criterio de selección en el cual se eligieron las que presentaban un crecimiento con la morfología de *E. coli* en este medio, colonias circulares de color morado o rosa (Fig.1). Así como también se seleccionaron las que crecieron en el medio las cuales eran presuntivamente resistentes a CTX.

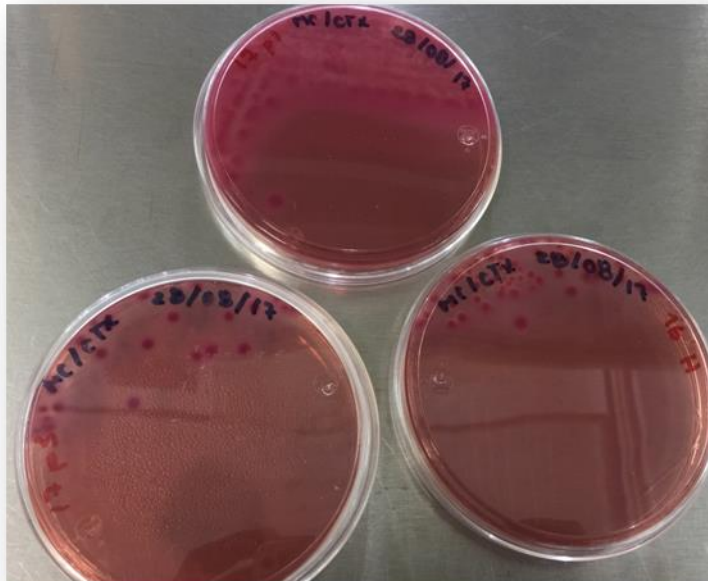


Fig 4. Placas McConkey sembradas con *E. coli*

Tras utilizar este criterio se obtuvieron un total de 42 cepas como probables *E. coli*, de las cuales 19 fueron aisladas de humanos (45.23%) y 23 aisladas de perros

(54.76 %) (Fig 4). Solo en 8 casos coincidió el crecimiento tanto en perros como sus dueños (parejas).

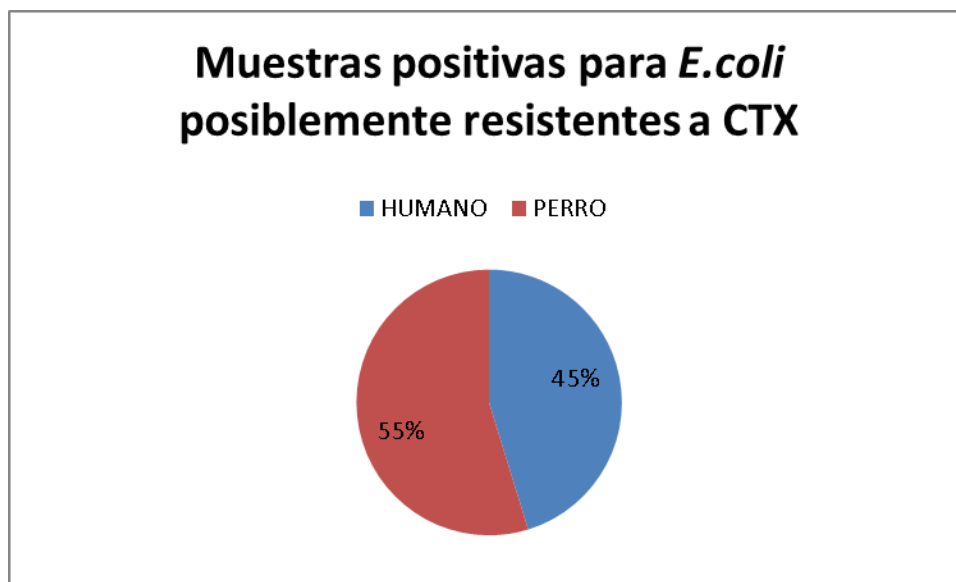


Fig 5. Muestras positivas para *E. coli* crecidas en medio con 2 ug/ml de CTX.

A las 42 cepas aisladas se les realizaron las 7 pruebas bioquímicas estándar utilizadas para la identificación de *E. coli* y como resultado se obtuvo que 36 cepas presentaron las características fenotípicas de *E. coli*, 1 cepa identificada como *Klebsiella spp* y 4 no identificadas en las pruebas bioquímicas. Finalmente, solo se obtuvieron 33 cepas de *E. coli* ya que 3 no fueron viables (Tabla 9).

Pruebas bioquímicas confirmatorias para identificar *E. coli*

Tabla 9: Resultados de las pruebas bioquímicas de las 42 cepas.

CEPA	TSI	LIA	M	I	O	CIT	UREA	PHE	RM	VP	Bacteria
1H	A/Ag	k/K	+	+	+	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>
1P	A/A	K/A	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>
3P	A/A	K/K	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>

3H	A/A	K/K	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>
7H	A/A	K/k	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>
8H	A/A	K/K	+	+	-	+	-	-	-	+	<i>Klebsiella spp</i>
9P	A/A	K/k	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>
17 P1	A/A	K/K	-	+	-	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>
20 H	A/A	K/K	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>
23 P	A/Ag	K/K	+	-	+	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>
24 H	A/Ag	K/K	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>
26 P	A/Ag	K/K	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>
27H	K/K	K/K	+	+	+	-	-	-	-	-	NI
27 P	A/A	K/Kg	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>
32 H	A/A	K/K	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>
36 P	A/Ag	K/Kg	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>
37 P	A/Ag	K/K	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>
12 P2	A/Ag	K/K	+	+	-	-	-	-	+	-	NI
18 P	A/Ag	k/K-	+	+	-	-	-	-	+	-	NI
18H	A/Ag	K/k	+	+	-	-	-	-	+	-	NI
7P*	A/Ag	K/K	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>
8 H*	A/Ag	K/K	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>
1P*	A/Ag	K/K	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>
9P*	A/Ag	K/K	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>
21H2	A/Ag	K/k	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>
21P2	A/Ag	K/k	-	+	-	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>
12P2*	A/Ag	K/K	-	+	-	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>
13 P*	A/Ag	K/k	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>
5 H*	A/A	K/k	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>
19 P*	A/Ag	K/k	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>

12 H*	A/A	K/k	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>
34 P*	A/Ag	K/k	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>
29 H*	A/Ag	K/k	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>
31 P*	A/Ag	K/k	+	+	+	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>
PAREJAS											
2H	A/Ag	K/K	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>
2P	A/A	K/K	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>
17H	A/Ag	K/k	+	-	-	+	+	-	-	-	<i>E. coli</i>
17P3	A/Ag	k/K	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>
20 H*	A/Ag	K/k	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>
20 P*	A/Ag	K/k	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>
21 H	A/Ag	K/K	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>
21 P	A/Ag	K/K	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>E. coli</i>

TSI: Agar hierro triple azúcar, A/A= ácido, K/K= básico; A/Ag: gas y K/Kg producción de SH:ácido sulfhídrico, LIA: agar hierro lisina, M: movilidad, I: indol, O: ornitina; CIT: citrato; UREA: ureasa; Phe: fenilalanina; RM: rojo de metilo; VP: Vogues Proskauer.

En color amarillo (NI) se muestran las cepas no identificadas y en color negro las cepas que dejaron de ser viables.

OBJETIVO 2: Determinar la susceptibilidad antimicrobiana a las cepas aisladas e identificadas.

Una vez realizadas las pruebas bioquímicas se procedió a realizar el perfil de resistencia fenotípico mediante antibiogramas utilizando el método de Kirby Bauer y probando antibióticos recomendados por el CLSI 2018, como de la familia de los antibióticos β -lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, tetraciclinas, sulfanomidas.

Ya que se obtuvieron los resultados se cotejaron con los puntos de corte del manual del CLSCI (2018) para finalmente obtener el perfil de resistencia de las 33 cepas de *E. coli*.

Se obtuvo que un 57.42% del total de muestras fueron resistentes a la familia de los β -lactámicos, 3.96% resistentes a carbapenémicos, 13.86% resistentes a aminoglucósidos, 8.91% resistentes a tetraciclinas, 13.2% resistentes a quinolonas, 7.92% resistentes a inhibidores del folato, 4.95% resistentes a fenicoles. (Tabla 10 y gráfica 1)

PERFIL DE RESISTENCIA

Tabla 10. Perfil de resistencia a antibióticos de *E. coli* cepas

CEP A	B-LACTÁMICOS								CARBAP ENEMIC OS		AMINOGLUC ÓSIDOS			TE TR ACI CLI NA S	QUINO LONA S		Inh ibi dor es- fol ato	FE NIC OL ES
	A M C	C T X	C A Z	FEP	AT M	AM P	FO X	CR O	IMP	ME M	A N	GM	S	TE	CIP	N A	SXT	C
1H	I	R	R	R	R	R	S	R	S	S	I	I	R	S	I	I	S	I
1P	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
2H	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	S	I	R	R	S	R	I	S
2P	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R
3P	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
3H	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	I	R	S
7H	S	R	I	I	R	R	S	R	S	S	S	S	I	R	I	S	S	S
9P	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	I	R	R	R	R	R
17 H	I	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	I	R	S
17P 3	S	R	R	R	R	R	I	R	S	S	S	S	R	R	S	R	R	S
20 H	S	R	I	R	R	R	S	R	S	S	S	R	I	S	S	S	S	R
21 P	S	R	R	R	R	R	S	R	S	S	I	R	R	R	S	R	R	S
21	I	R	R	R	S	R	S	R	S	I	S	S	R	R	I	I	S	S

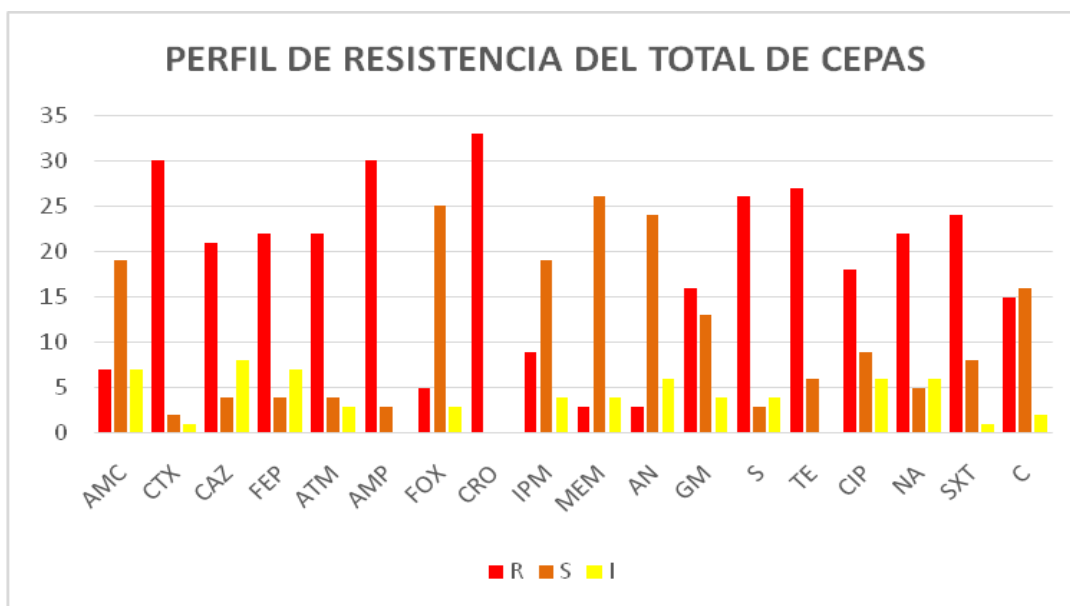
H2																		
23 P	S	R	R	I	R	R	S	R	R	S	S	I	R	R	R	R	S	R
24 H	R	R	R	R	R	R	I	R	S	I	R	I	R	R	R	R	R	S
26 P	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R	S
27 P	S	R	I	I	I	R	S	R	S	S	I	S	R	S	S	S	S	R
32 H	I	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S
36 P	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	I	I	R	R
37 P	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R
7P*	I	R	R	R	R	R	S	R	I	I	I	R	R	R	I	R	R	S
1P*	S	R	I	I	S	R	I	R	I	S	I	S	R	R	R	R	R	S
8 H*	R	I	R	S	S	R	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S
9P*	S	R	I	R	R	R	S	R	S	S	I	R	R	R	R	R	R	R
12 P2*	S	R	I	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	I	I	R	R
13 P*	R	R	S	I	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
5 H*	S	R	S	I	I	R	R	R	I	S	S	S	R	R	R	R	R	I
12 H*	S	R	R	R	I	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R
20 P*	I	R	I	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S
20 H*	S	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R
34 P*	I	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S	R	R	R	S	S
29 H*	S	R	I	R	R	R	S	R	S	S	S	R	I	R	R	R	R	R

31 p*	S	R	R	I	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R
----------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Nota: S: sensible; I, intermedio; R: resistente.

Amoxicilina con ácido clavulánico (AMC), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), cefepime (FEP), aztreonam (ATM), Ampicilina (AM), cefoxitina (FOX), ceftriaxona (CRO) imipenem (IPM), meropenem (MEM), amikacina (AN), gentamicina (GM), estreptomicina (S), tetraciclina (TE), ciprofloxacino (CIP), ácido nalidíxico (NA), trimetropim con sulfametoxasol (SXT), cloranfenicol (C).

Grafica 1. Perfil de resistencia de cepas



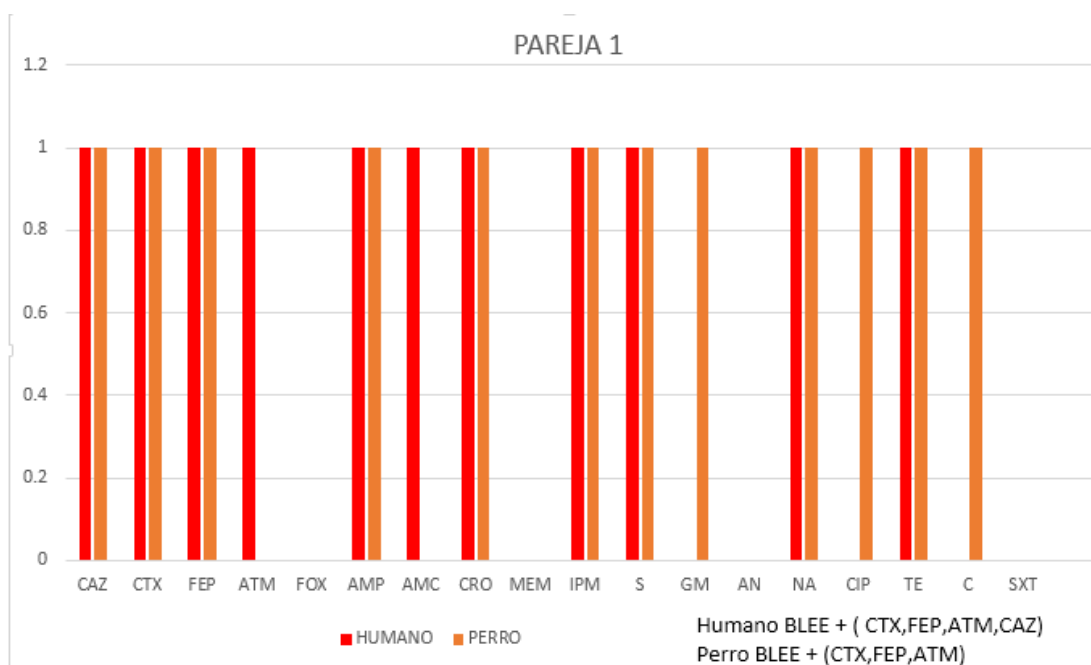
Amoxicilina con ácido clavulánico (AMC), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), cefepime (FEP), aztreonam (ATM), Ampicilina (AM), cefoxitina (FOX), ceftriaxona (CRO) imipenem (IPM), meropenem (MEM), amikacina (AN), gentamicina (GM), estreptomicina (S), tetraciclina (TE), ciprofloxacino (CIP), ácido nalidíxico (NA), trimetropim con sulfametoxasol (SXT), cloranfenicol (C).

Se obtuvo que 30 cepas fueron resistentes a CTX; 21 a CAZ; 7 a AMC; 22 a FEP; 22 a ATM; 5 a FOX; 9 a IMP; 3 a MEM; 3 a AN; 16 a GM; 26 a S; 27 a TE; 18 a CIP; 22

a NA; 24 a SXT y 15 a C. Interesantemente se obtuvo que el total de muestras (33) fueron resistentes a ceftriaxona (CRO).

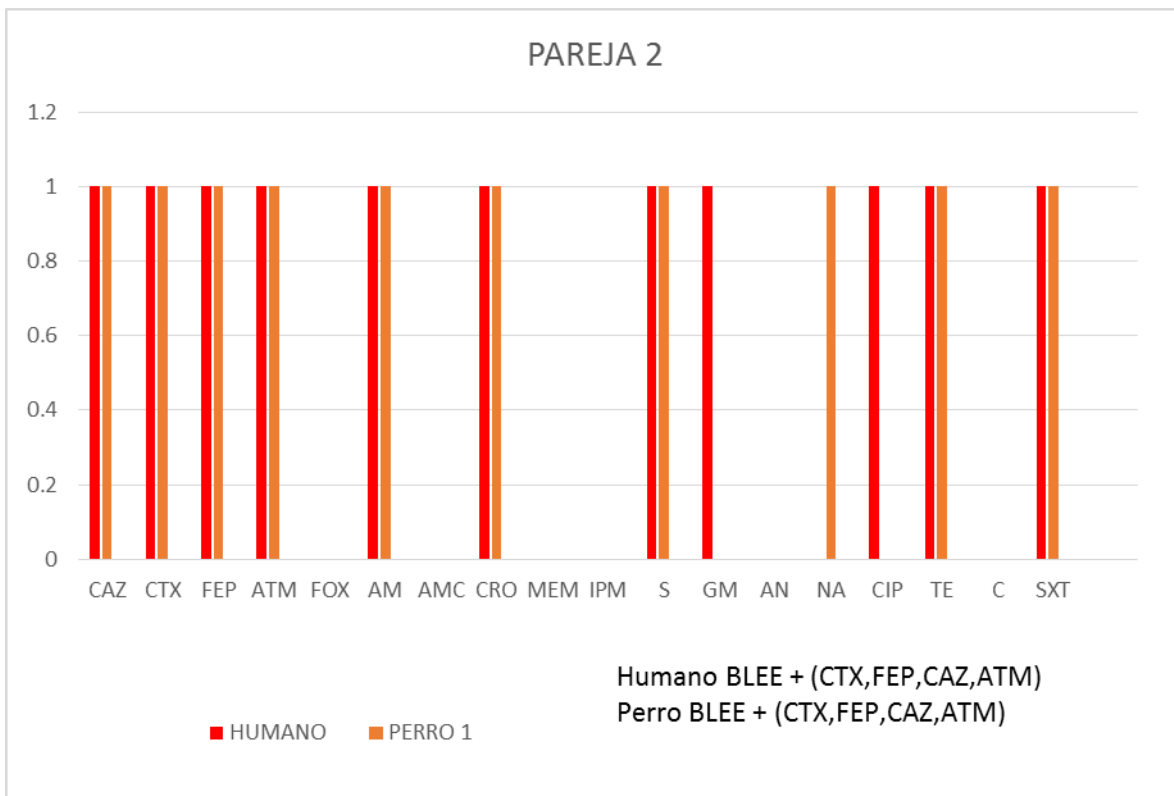
De las cepas totales, 4 parejas formadas por una muestra de humano (dueño) y la muestra de su perro, se observó que presentaban un patrón de resistencia muy similar por parejas, obteniendo los siguientes resultados.

La pareja 1 conformada por las cepas 2H y 2P fueron las que presentaron mayor similitud en su perfil de resistencia, obteniendo resistencia tanto en el humano como en el perro en los siguientes antibióticos: CAZ, CTX, FEP AMP, AMC, CRO, IPM, S, NA Y TE (Fig 2). Seguida de la pareja 3 formada por las cepas 20H1 y 20P1 que presentaron similitud en la resistencia de CTX, FEP, ATM, AMP, CRO, S, GM, NA, CIP, TE y SXT (Fig 4). La pareja 2 formada por las cepas 17H y 17P3 presentaron similitud en la resistencia en CAZ, CTX, FEP, ATM, AM, CRO, S, TE y SXT (Fig 3) y la pareja 4 formada por las cepas 21H y 21P presentó la menor similitud en la resistencia en CAZ, CTX, FEP, AM, CRO, S y TE (Fig 5).

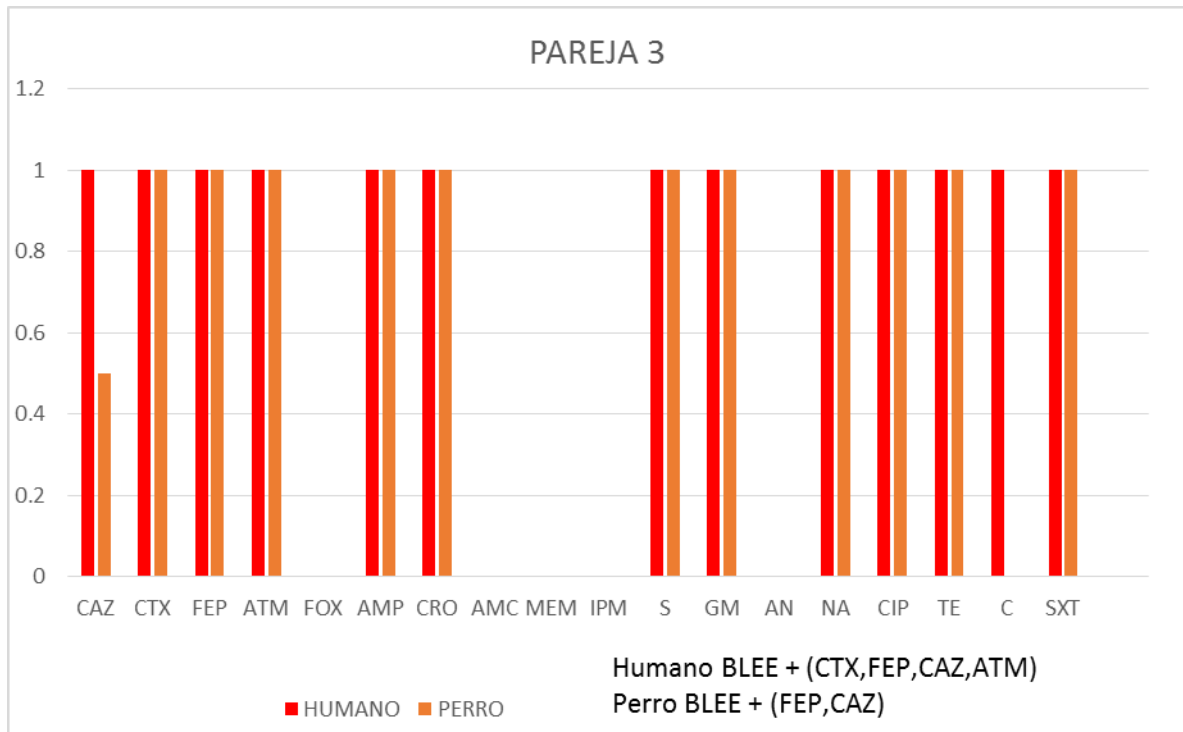


Grafica 2. Gráfica que muestra perfil de susceptibilidad de las cepas de *E. coli* obtenidas de la pareja humano-perro: 2H y 2P, donde se muestra el valor de 1 si son resistentes, de y de 0 si son sensibles. Ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX), cefepime (FEP), aztreonam (ATM), ceftioxitina (FOX), ampicilina (AM), ceftriaxona (CRO), meropenem (MEM), imipenem (IPM),

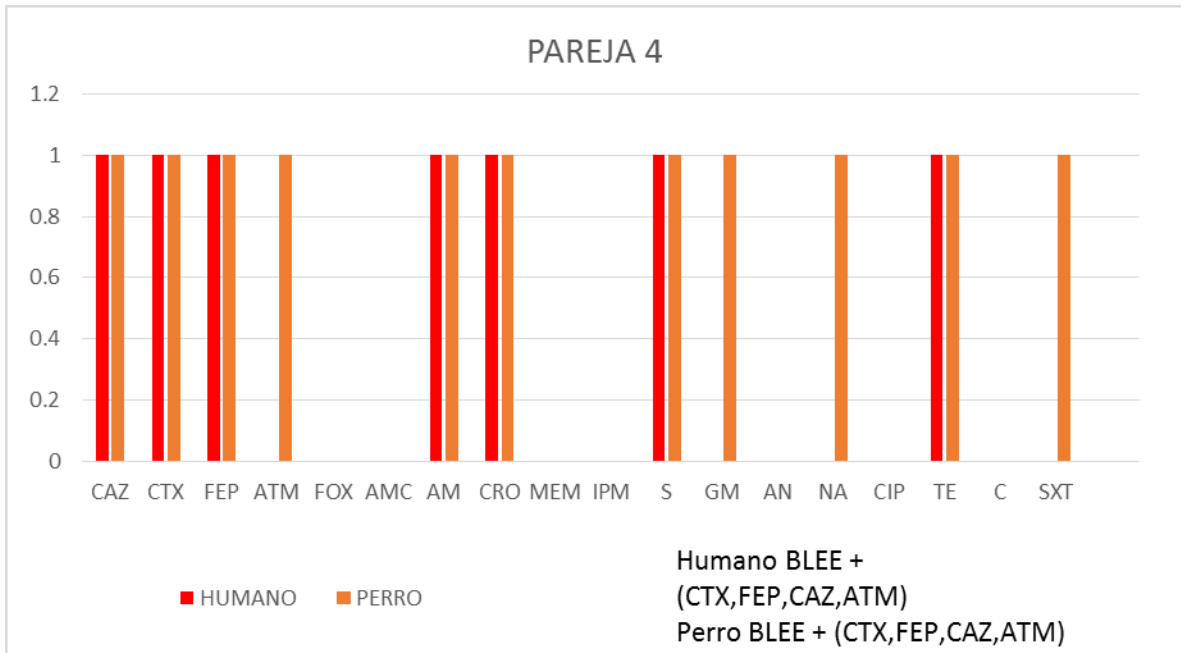
estreptomicina (S), gentamicina (GM), amikacina (AN), ácido nalidíxico (NA), ciprofloxacino (CIP), tetraciclina (TE), cloranfenicol (C), trimetoprim con sulfametoxazol (SXT).



Gráfica 3. Gráfica que muestra perfil de susceptibilidad de las cepas de *E. coli* obtenidas de la pareja humano-perro: 17H y 17P3, donde se muestra el valor de 1 si son resistentes y de 0 si son sensibles. Ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX), cefepime (FEP), aztreonam (ATM), cefoxitina (FOX), ampicilina (AM), ceftriaxona (CRO), meropenem (MEM), imipenem (IPM), estreptomicina (S), gentamicina (GM), amikacina (AN), ácido nalidíxico (NA), ciprofloxacino (CIP), tetraciclina (TE), cloranfenicol (C), trimetoprim con sulfametoxazol (SXT) y amoxicilina con ácido clavulánico (AMC).



Grafica 4. . Gráfica que muestra perfil de susceptibilidad de las cepas de *E. coli* obtenidas de la pareja humano-perro: 20H1 y 20P1, donde se muestra el valor de 1 si son resistentes, de 0.5 si son intermedias y de 0 si son sensibles. Ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX), cefepime (FEP), aztreonam (ATM), cefoxitina (FOX), ampicilina (AM), ceftriaxona (CRO), meropenem (MEM), imipenem (IPM), estreptomycin (S), gentamicina (GM), amikacina (AN), ácido nalidíxico (NA), ciprofloxacino (CIP), tetraciclina (TE), cloranfenicol (C), trimetropim con sulfametoxasol (SXT) y amoxicilina con ácido clavulánico (AMC).



Gráfica 5. Gráfica que muestra perfil de susceptibilidad de las cepas de *E. coli* obtenidas de la pareja humano-perro: 21H y 21P, donde se muestra el valor de 1 si son resistentes y de 0 si son sensibles. Cefotaxidima (CAZ), cefotaxima (CTX), cefepime (FEP), aztreonam (ATM), cefoxitina (FOX), ampicilina (AM), ceftriaxona (CRO), meropenem (MEM), imipenem (IPM), estreptomicina (S), gentamicina (GM), amikacina (AN), ácido nalidíxico (NA), ciprofloxacino (CIP), tetraciclina (TE), cloranfenicol (C), trimetropim con sulfametoxazol (SXT) y amoxicilina con ácido clavulánico (AMC).

Objetivo 3. Determinar el fenotipo de producción de β-Lactamasa de Espectro Extendido (BLEE) en las cepas de *E. coli*.

Se realizó una prueba de difusión de doble disco para determinar el fenotipo BLEE en las cepas de perros y sus dueños, utilizando los antibióticos AMC; CTX; CAZ; FEP y ATM.

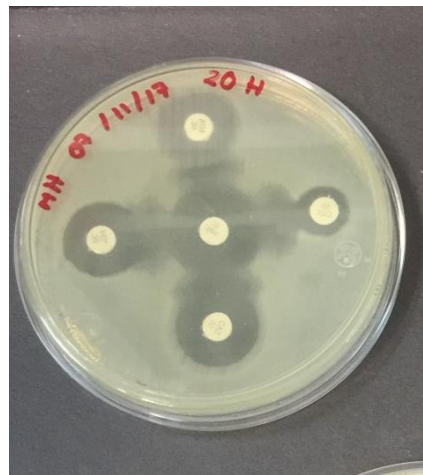
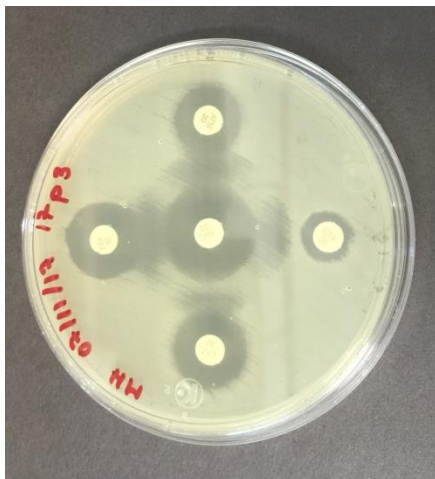


Fig 6. Patrón en “cola de pescado” indicador de la presencia del fenotipo BLEE

Tabla 11. Resistencia en fenotipo BLEE

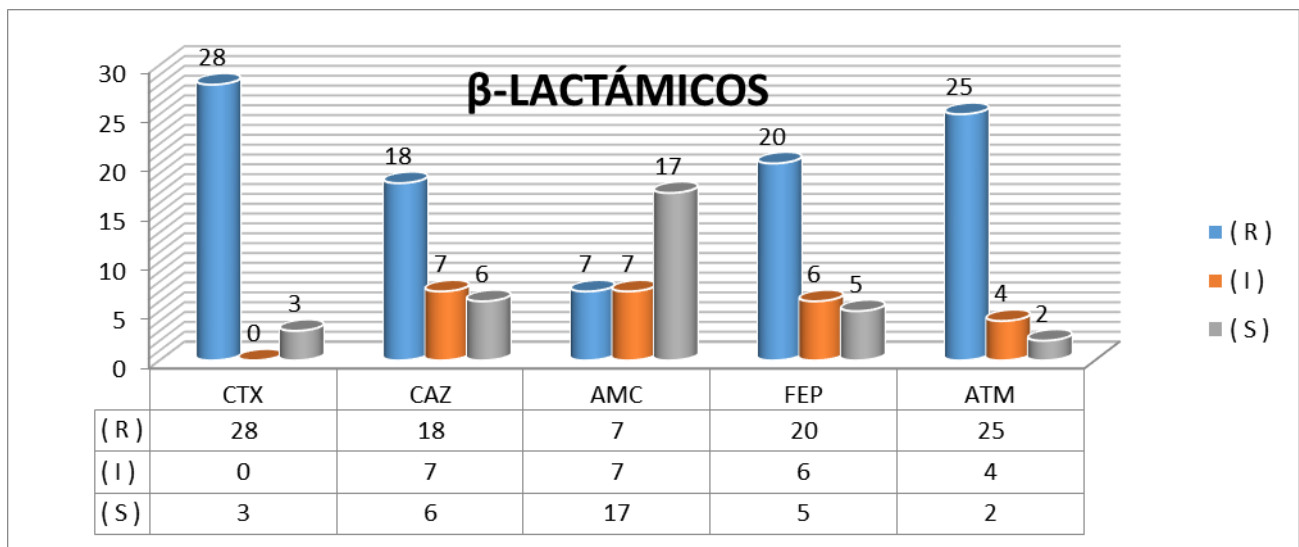
CEPA	BACTERIA	AMC	CAZ	CTX	FEP	ATM	BLEE
1P	<i>E.coli</i>	S	S	S	S	R	+
3P	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	+
20 H	<i>E.coli</i>	S	I	R	R	R	+
24 H	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	+
7 H	<i>E.coli</i>	S	I	R	I	R	+
8 H*	<i>E.coli</i>	I	R	R	S	S	+
32 H	<i>E.coli</i>	I	R	R	R	R	+
12H*	<i>E.coli</i>	S	R	R	R	I	+
29 H*	<i>E.coli</i>	S	I	R	R	R	+
5 H*	<i>E.coli</i>	S	S	R	I	I	+
12P2*	<i>E.coli</i>	S	I	R	R	R	+
13 P*	<i>E.coli</i>	R	S	R	I	R	+
23 P	<i>E.coli</i>	S	R	R	I	R	+
37 P	<i>E.coli</i>	S	R	R	R	R	+
9 P	<i>E.coli</i>	S	I	R	I	R	+
9 P*	<i>E.coli</i>	S	I	R	R	R	+
7P*	<i>E.coli</i>	I	R	R	R	R	+
27P	<i>E.coli</i>	S	I	R	I	I	+
34 P*	<i>E.coli</i>	I	R	R	R	R	+
31 P*	<i>E.coli</i>	S	R	S	R	R	+
1 P*	<i>E.coli</i>	S	I	R	I	S	+
PAREJAS							
2H	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	+

2P	<i>E.coli</i>	S	R	R	R	R	+
17 H	<i>E.coli</i>	I	R	R	R	R	+
17 P3	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	+
20 H*	<i>E.coli</i>	I	R	R	R	R	+
20P*	<i>E.coli</i>	I	I	R	R	R	+
21 H	<i>E.coli</i>	I	R	R	R	S	+
21 P	<i>E.coli</i>	S	R	R	R	R	+

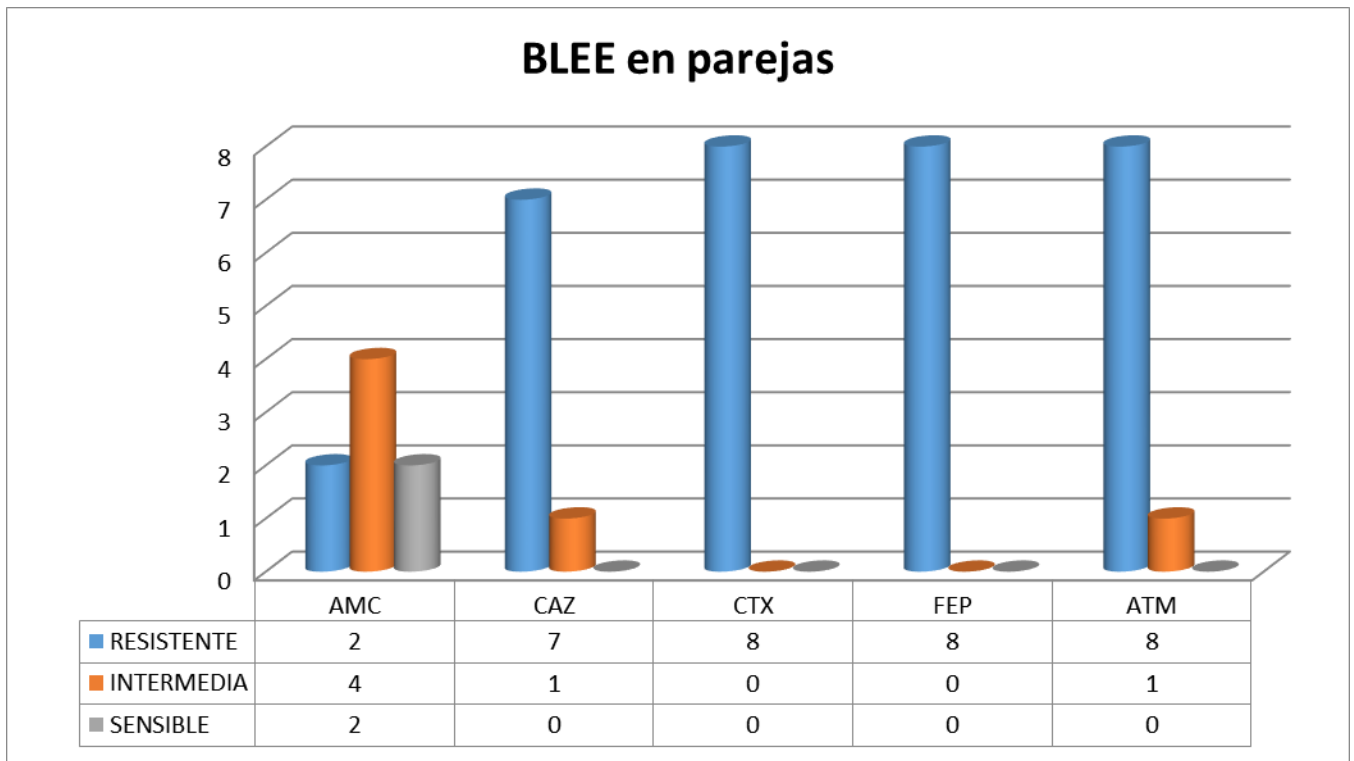
De las 33 cepas identificadas como *E. coli*; 97% fueron resistentes a CTX y 3% sensibles; en el caso de CAZ 58.06% resistentes, 22.58% intermedias y 19.35% sensibles; para AMC 22.58% resistentes, 22.58 intermedias y 54.83 sensibles; para FEP 64.51% resistentes, 19.35% intermedias y 16.12% sensibles. Finalmente, para ATM se presentó 80.64% de resistencia, 12.90 intermedias y 6.45 sensibles (Gráfica 6).

Se obtuvo que las 8 cepas de parejas fueron positivas para BLEE. Se presentaron 2 resistentes a AMC, 7 a CAZ; 8 a CTX; 8 a FEP y 8 a ATM. (Gráfica 7).

Gráfica 6. Fenotipo BLEE en cepas totales



Grafica 7. Fenotipo BLEE en parejas



Objetivo 4. Identificar genes que codifican para las BLEE tipo CTX-M, TEM y SHV en los aislamientos de *E. coli*, mediante PCR y secuenciación.

Búsqueda de genes BLEE

Se utilizó la técnica de PCR para amplificar los genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, en las cepas que presentaron multirresistencia a los antibióticos β-lactámicos y que además fueran positivas a la prueba fenotípica de producción de BLEE. Se realizó esta técnica en 28 muestras, de las cuales 8 fueron pareja entre el perro y su dueño 1 positiva para *bla*_{TEM}, 23 positivas para *bla*_{CTX-M-U}, 22 positivas para *bla*_{CTX-M-1} y 1 para *bla*_{SHV}.

GEN TEM

A)

B)

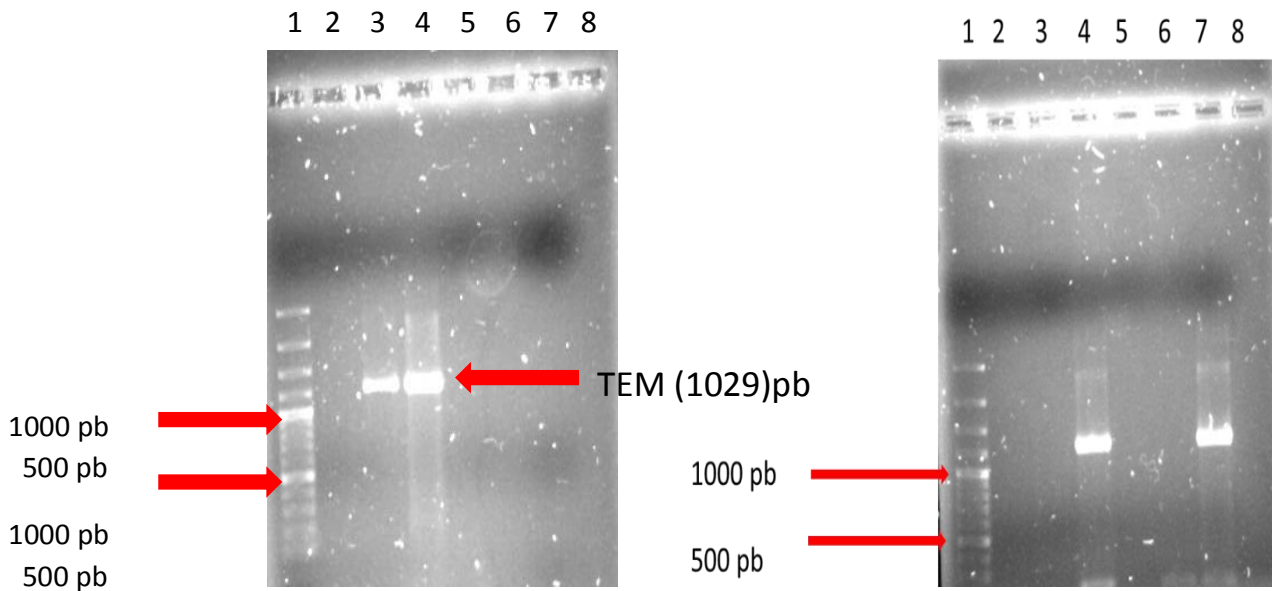
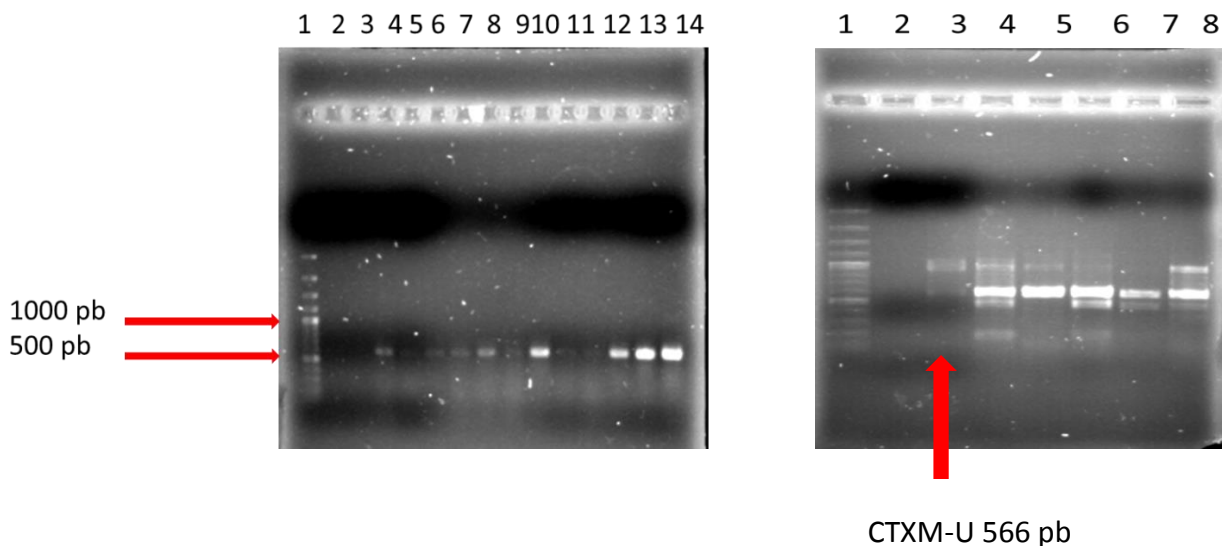


Fig 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación del gen *bla_{TEM}*. La figura A muestra una electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del gen *bla_{TEM}* con un peso de 1029 pb. En el pocillo 1 se encuentra el marcador de peso molecular; 2: control negativo; 3: control positivo (*bla_{TEM}*); 4: cepa 2H; 5: cepa 2P; 6: cepa 17H; 7: cepa 7p3. La figura B) muestra en el pocillo 1 marcador de peso molecular; 2: control negativo; 3: control positivo (*bla_{TEM}*) (no se obtuvo) 4: cepa 20H*; 5: cepa 20P*; 6: cepa 21H; 7: cepa 21P.

GEN CTXM-U

A)

B)



C)

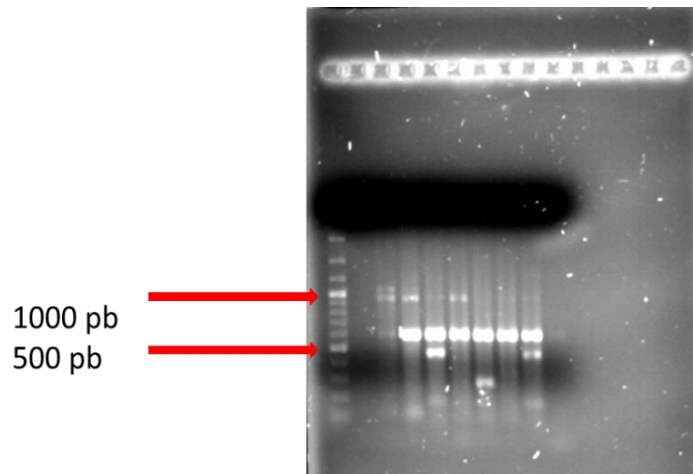


Fig 8. Electroforesis del gen *bla*_{CTXM-U} en parejas. La figura A muestra electroforesis corrida en gel de agarosa al 1% de la amplificación del gen *bla*_{CTXM-U} con un peso de 566 pb. En el pocillo 1 marcador de peso molecular; 2: control negativo; 3: control positivo (*bla*_{CTXM-U}); 4: cepa 2H; 5: cepa 2P; 6: cepa 17H; 7: cepa 17P3; 8: cepa 20H*; 9: cepa 20P*; 10: cepa 21H; 11: cepa 21P; 12: cepa 27p; 13: cepa 27P; 14: cepa 32H. La figura B muestra en el pocillo 1: marcador de peso molecular; 2: control negativo; 3: control positivo (*bla*_{CTXM-U}); 4: cepa 7H; 5: cepa 37P; 6: cepa 7P*; 7: cepa 24H; 8: cepa 1P. La figura C muestra en el pocillo 1: marcador de peso molecular; en el 2: control negativo; en el 3: control positivo (*bla* CTXM-U); 4: cepa 19H*; 5: cepa 9P*; 6: cepa 5H*; 7: cepa 31P; 8: cepa 3P.

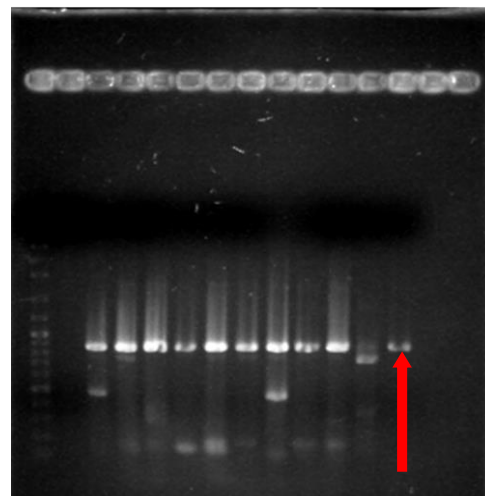
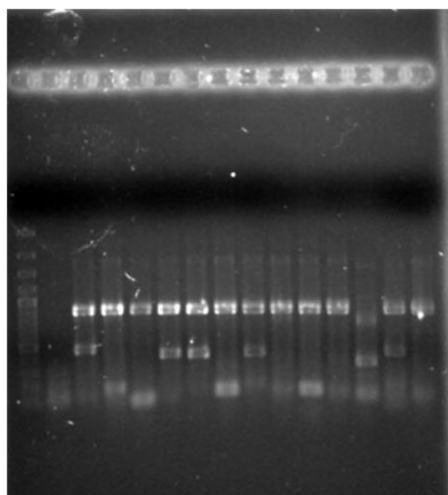
GEN CTXM-1

A)

B)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



CTXM-1 876 pb 62

Fig 9. Electroforesis de gel 1 de parejas de cepas (humano/mascota) del gen *bla_{CTXM-1}*. La figura A muestra una electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del gen *bla_{CTXM-1}* con un peso de 876 pb. En el pocillo 1 marcador de peso molecular; 2: control negativo; 3: control positivo (*bla_{CTXM-1}*); 4: cepa 2H; 5: cepa 2P; 6: cepa 17H; 7: cepa 17P3; 8: cepa 20H*; 9: cepa 20P*; 10: cepa 21H; 11: cepa 21P; 12: cepa 9P*; 13: cepa 5H*; 14: cepa 34p*. En la figura B se muestra en el pocillo 1 marcador de peso molecular; 2: control negativo; 3: control positivo (*bla_{CTXM-1}*); 4: cepa 1H; 5: cepa 27P; 6: cepa 7P*; 7: cepa 19H*; 8: cepa 13P*; 9: cepa 23P; 10: cepa 12P2; 11: cepa 12H2; 12: cepa 32H; 13: cepa 7 H; 14: cepa 24H.

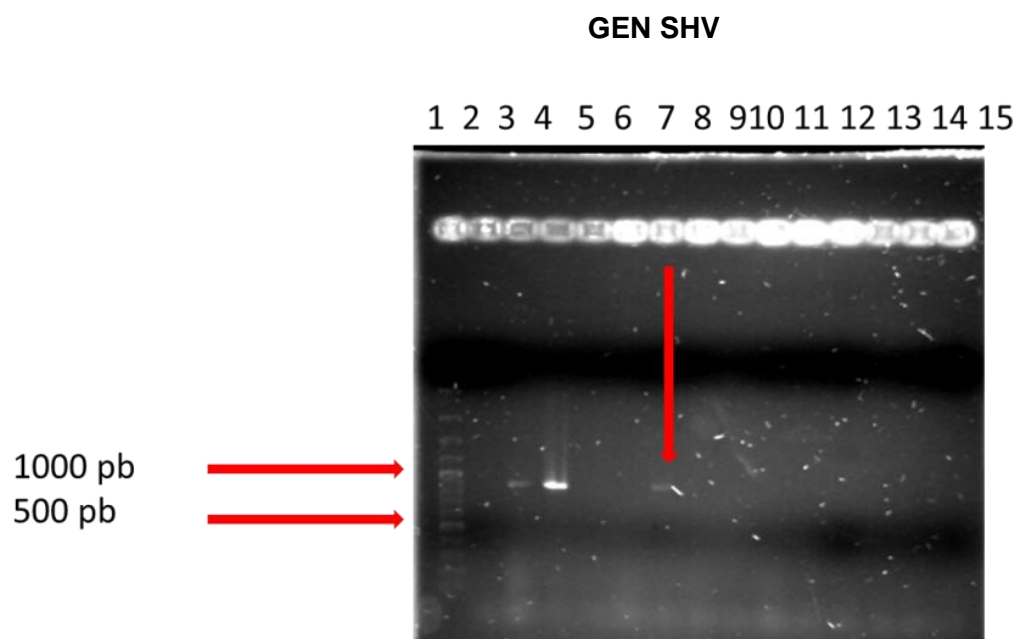


Fig 10. Electroforesis de gel 1 de parejas de cepas (humano/mascota) del gen *bla_{SHV}*. Electroforesis corrida en gel de agarosa al 1% de la amplificación del gen *bla_{SHV}* con un peso de 883 pb. En el 2: control negativo; 3: control positivo (*bla_{SHV}*); 4: otro control positivo; 5: cepa 2H; 6: cepa 2P; 7: cepa 17H; 8: cepa 17P3; 9: cepa 20H*; 10: cepa 2OP*; 11: cepa 21H; 12: cepa 21p; 13: cepa 27P; 14: cepa 9P*; 15: cepa 5H*.

SECUENCIACIÓN DE GENES BLEE CTXM

Se seleccionaron las 8 muestras de parejas, 4 humanos y 4 perros debido a que se identificó la presencia del gen CTXM-1 mediante PCR y corrimiento en gel de agarosa al 1% en ambas muestras. Estos genes se purificaron utilizando el Zymoclean® Gel DNA recovery kit. Posteriormente se corrieron en gel de agarosa y se observaron en el fotodocumentador para confirmar la presencia, se midió su concentración en el Nanodrop® y los genes amplificados se enviaron a secuenciar en el laboratorio Nacional de Genómica para la biodiversidad (LANGEBIO) del centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV).

Las secuencias recibidas se visualizaron en el programa Finch TV versión 1.4.0 Geospiza (;) y se analizaron con herramientas informáticas en la web BLAST, BLAST2.0 del National Center for Biotechnology Information Site (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/), donde se compararon con secuencias incluidas en la base de datos de GenBank.

Se realizó un alineamiento con el programa Clustal Omega entre la secuencia del gen CTXM-15 contra la secuencia obtenida de cada una de las 8 muestras de perro y su dueño. Obteniendo los siguientes alineamientos del extremo amino terminal del gen bla_{CTXM-15}.

Pareja 2H y 2P

CTXM15	ATGGTTAAAAAATCACTGCGCCAGTTTACGCTGATGGCGACGGCAACCGTCACGCTGTTG	60
2H	-----AGGCACCGTCACGCTGTTG	19
2P	-----AGGCACCGTCACGCTGTTG	19
	* *****	
CTXM15	TTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAAACCTGCCGAATTA	120
2H	TTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAAACCTGCCGAATTA	79
2P	TTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAAACCTGCCGAATTA	79

CTXM15	GAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAAATTCGCAA	180
2H	GAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAAATTCGCAA	139
2P	GAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAAATTCGCAA	139

CTXM15	ATACTTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGCCGCG	240
2H	ATACTTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGCCGCG	199
2P	ATACTTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGCCGCG	199

CTXM15	GCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTAAAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATC	300
2H	GCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTAAAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATC	259
2P	GCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTAAAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATC	259

CTXM15	AAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTC AATGGGACGATG	360
2H	AAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTC AATGGGACGATG	319

2P	AAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTG----- *****	293
CTXM15	TCACTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATGAATAAG	420
2H	TCACTGGCTGA-----	330
2P	-----	293
CTXM15	CTGATTGCTCACGTTGGCGGCCGCTAGCGTCACCGCGTTCGCCGACAGCTGGGAGAC	480
2H	-----	330
2P	-----	293
CTXM15	GAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGGCGATCCG	540
2H	-----	330
2P	-----	293
CTXM15	CGTGATACCACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAACCTCTGCGGAATCTGACGCTGGGTAAA	600
2H	-----	330
2P	-----	293
CTXM15	GCATTGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCACCGGT	660
2H	-----	330
2P	-----	293
CTXM15	GCAGCGAGCATTCAGGCTGGACTGCCTGCTTCTGGGTTGTGGGGGATAAAACCGGCAGC	720
2H	-----	330
2P	-----	293
CTXM15	GGTGGCTATGGCACCACCAACGATATCGCGGTGATCTGGCCAAAAGATCGTGCGCCGCTG	780
2H	-----	330
2P	-----	293
CTXM15	ATTCTGGTCACTTACTTCACCCAGCCTCAACCTAAGGCAGAAAGCCGTCGCGATGTATTA	840
2H	-----	330
2P	-----	293
CTXM15	CGGTCGGCGGCTAAAATCGTCACCGACGGTTTGTA	876
2H	-----	330
2P	-----	293

Fig 11. Alineamiento de la secuencia del extremo amino terminal del gen *bla_{CTXM-15}* de la pareja de cepas 2H y 2P

Pareja 17H y 17P3

CTXM15	ATGGTTAAAAAATCACTGCGCCAGTTCACGCTGATGGCGACGGCAACCGTCACGCTGTTG	60
17H	-----AGGCACCGTCACGCTGTTG	19
17P3	-----GGCACCGTCACGCTGTTG * *****	18
CTXM15	TTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAAACCTTGCCGAATTA	120
17H	TTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAAACCTTGCCGAATTA	79
17P3	TTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAAACCTTGCCGAATTA *****	78
CTXM15	GAGCGGACGTCCGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAAATTCGCAA	180
17H	GAGCGGACGTCCGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAAATTCGCAA	139

17P3	GAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAATTCGCAA *****	138
CTXM15	ATACTTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGCCGCG	240
17H	ATACTTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGCCGCG	199
17P3	ATACTTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGCCGCG *****	198
CTXM15	GCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATC	300
17H	GCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATC	259
17P3	GCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTG----- *****	220
CTXM15	AAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCAATGGGACGATG	360
17H	AAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTG-----	293
17P3	----- -----	220
CTXM15	TCACTGGCTGAGCTTAGCGCGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATGAATAAG	420
17H	-----	293
17P3	----- -----	220
CTXM15	CTGATTGCTCAGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCGCCCCACAGCTGGGAGAC	480
17H	-----	293
17P3	----- -----	220
CTXM15	GAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTAAACACCGCCATTCGGGGCGATCCG	540
17H	-----	293
17P3	----- -----	220
CTXM15	CGTGATACCACCTTACCTCGGGCAATGGCGCAAACCTGCGGAATCTGACGCTGGGTAAA	600
17H	-----	293
17P3	----- -----	220
CTXM15	GCATTGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCACCGGT	660
17H	-----	293
17P3	----- -----	220
CTXM15	GCAAGCAGCATTCAGGCTGGACTGCCTGCTTCTGGGTTGTGGGGATAAAACCGGCAGC	720
17H	-----	293
17P3	----- -----	220
CTXM15	GGTGGCTATGGCACCACCAACGATATCGCGGTGATCTGGCCAAAAGATCGTGCGCCGCTG	780
17H	-----	293
17P3	----- -----	220
CTXM15	ATTCTGGTCACTTACTTCACCAGCCTCAACCTAAGGCAGAAAGCCGTCGCGATGTATTA	840
17H	-----	293
17P3	----- -----	220
CTXM15	GCGTCGGCGGCTAAAATCGTCACCGACGGTTTGTA	876
17H	-----	293
17P3	----- -----	220

Fig 12. Alineamiento de secuencia del extremo amino terminal del gen bla_{CTXM-15} de la pareja 17 H y 17P3.

Pareja 20H1 y 20P1

20P1	-----AGGCACCGTCACGCTGTTG	19
CTXM15	ATGGTTAAAAAATCACTGCGCCAGTTACGCTGATGGCGACGGCAACCGTCACGCTGTTG	60
20H1	-----AGGCACCGTCACGCTGTTG *****	18
20P1	TTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAAACCTGCCGAATTA	79
CTXM15	TTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAAACCTGCCGAATTA	120
20H1	TTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAAACCTGCCGAATTA *****	78
20P1	GAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAAATTCGCAA	139
CTXM15	GAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAAATTCGCAA	180
20H1	GAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAAATTCGCAA *****	138
20P1	ATACTTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGCCGTG	199
CTXM15	ATACTTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGCCGTG	240
20H1	ATACTTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGCCGTG ***** *	198
20P1	GCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTAAAGCGAACCGAATCTG-----	238
CTXM15	GCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTAAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATC	300
20H1	GCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTAAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATC *****	258
20P1	-----	238
CTXM15	AAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCAATGGGACGATG	360
20H1	AAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTG-----	292
20P1	-----	238
CTXM15	TCACTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATGAATAAG	420
20H1	-----	292
20P1	-----	238
CTXM15	CTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTGCGCCGACAGCTGGGAGAC	480
20H1	-----	292
20P1	-----	238
CTXM15	GAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGGCGATCCG	540
20H1	-----	292
20P1	-----	238
CTXM15	CGTGATACCACCTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAACCTGCGGAATCTGACGCTGGGTAAA	600
20H1	-----	292
20P1	-----	238
CTXM15	GCATTGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCACCGGT	660
20H1	-----	292
20P1	-----	238
CTXM15	GCAGCGAGCATTCAGGCTGGAAGTGCCTGCTTCTGGGTTGTGGGGGATAAAACCGGCAGC	720
20H1	-----	292
20P1	-----	238
CTXM15	GGTGGCTATGGCACCACCAACGATATCGCGGTGATCTGGCCAAAAGATCGTGCGCCGCTG	780
20H1	-----	292
20P1	-----	238
CTXM15	ATTCTGGTCACTTACTTCACCAGCCTCAACCTAAGGCAGAAAGCCGTCGCGATGTATTA	840
20H1	-----	292

20P1	-----	238
CTXM15	GCGTCGGCGGCTAAAAATCGTCCACGCGGTTTGTA	876
20H1	-----	292

Fig 13. Alineamiento de secuencia del extremo amino terminal del gen bla_{CTXM-15} de la pareja 20H1 y 20P1.

Pareja 21H y 21P

21H	-----AGGCACCGTCCAGCTGTTG	19
CTXM15	ATGGTTAAAAAATCACTGCGCCAGTTCACGCTGATGGCGACGGCAACCGTCCAGCTGTTG	60
21P	-----GTCACGCTGTTG	12

21H	TTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAAACTTGCCGAATTA	79
CTXM15	TTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAAACTTGCCGAATTA	120
21P	TTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAAACTTGCCGAATTA	72

21H	GAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAATTCGCAA	139
CTXM15	GAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAATTCGCAA	180
21P	GAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAATTCGCAA	132

21H	ATACTTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTCGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGCCGCG	199
CTXM15	ATACTTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTCGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGCCGCG	240
21P	ATACTTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTCGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGCCGCTG	192

21H	GCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATC	259
CTXM15	GCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATC	300
21P	GCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATC	252

21H	AAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCAGTCAATGGGACGATG	319
CTXM15	AAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCAGTCAATGGGACGATG	360
21P	AAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGTCCGTCAT-----	303

21H	TCACTG-----	325
CTXM15	TCACTGGCTGAGCTTAGCGCGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATGAATAAG	420
21P	-----	303
21H	-----	325
CTXM15	CTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCGCCCACAGCTGGGAGAC	480
21P	-----	303
21H	-----	325
CTXM15	GAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCGGGGCGATCCG	540
21P	-----	303
21H	-----	325
CTXM15	CGTGATACCACTTACCTCGGGCAATGGCGAACTCTGCGGAATCTGACGCTGGGTAAA	600
21P	-----	303
21H	-----	325
CTXM15	GCATTGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCACCGGT	660

21P	-----	303
21H	-----	325
CTXM15	GCAGCGAGCATTCAGGCTGGACTGCCCTGCTTCTGGGTTGTGGGGATAAAACCGGCAGC	720
21P	-----	303
21H	-----	325
CTXM15	GGTGGCTATGGCACCACCAACGATATCGCGGTGATCTGGCCAAAAGATCGTGCGCCGCTG	780
21P	-----	303
21H	-----	325
CTXM15	ATTCTGGTCACTTACTTCACCCAGCCTCAACCTAAGGCAGAAAGCCGTCGCGATGTATTA	840
21P	-----	303
21H	-----	325
CTXM15	GCGTCGGCGGCTAAAATCGTCACCGACGGTTTGTA	876
21P	-----	303

Fig 14. Alineamiento de secuencia del extremo amino terminal del gen **bla_{CTXM-15}** de la pareja 21H y 21P.

Al realizar un alineamiento de la secuencia de aminoácidos se obtuvo que la cepa 2H y la 17H son CTX-M-15, sin embargo para las cepas 2P y 21H el alineamiento corresponde con las secuencias de CTX-M-15 o CTX-M-123 de igual manera, la secuencia aminoacídica de la pareja 20H y 20P, así como de la cepa 21P, corresponden con la secuencia de CTX-M-1.

DISCUSIÓN

En la actualidad uno de los mayores problemas de salud pública a nivel mundial es la presencia de cepas de *E. coli* multirresistentes y que además presentan betalactamasas de espectro extendido tanto en humanos como en animales. Por lo tanto, se buscaron y estudiaron cepas asociadas a animales de compañía y sus dueños.

De las muestras recolectadas se obtuvieron 33 muestras de heces fecales, 14 de humanos y 19 de perros, en las cuales se identificó la bacteria *E. coli* y estas cepas presentaron resistencia a cefotaxima (CTX) y de las cuales 8 fueron pareja (perro-dueño).

Al realizar el perfil de susceptibilidad se observó un mayor índice de resistencia en antibióticos de la familia de los β -lactámicos y en menor medida a los carbapenémicos. Se presentó una cepa proveniente de un perro (3P) con resistencia a 15 antibióticos de los 17 probados. Así como también todas las cepas fueron resistentes a dos cefalosporinas de tercera generación. Cabe mencionar que estas muestras se tomaron de perros y dueños sanos por lo que es importante notar la multirresistencia en todas las cepas aisladas.

La resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación es un indicador de la presencia de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Inicialmente se observó la presencia de BLEE en la clínica médica humana; sin embargo, en recientes estudios en las últimas dos décadas, se ha observado un aumento en animales de compañía, aves de corral y ganado.

Se sabe que el uso de antibióticos β -lactámicos, especialmente cefalosporinas en la clínica veterinaria puede causar selección de Enterobacterias productoras de BLEE en animales y aumentar el riesgo de transmisión de estas bacterias ya que se encuentran conferidas en elementos genéticos movilizables como los plásmidos.

En México, existen pocos reportes acerca de la presencia de BLEE en cepas de *E. coli* aisladas de mascotas (Cortés.Cortés *et al.*, 2016). Por otro lado, no existen estudios de cepas aisladas de mascotas y sus dueños, por lo que en este proyecto se planteó el aislamiento de cepas de *E. coli* potencialmente resistentes a cefotaxima y que pudieran compartir características fenotípicas de multirresistencia y genotípicas como la presencia de algunos genes de BLEE.

Mientras que las primeras BLEE reportadas fueron TEM y SHV, la importancia de las enzimas del tipo CTX-M ha aumentado en las últimas décadas, así como su

diseminación a nivel mundial. Los tipos más frecuentes son CTXM-1, CTX-M14, CTX-M15. Se ha reportado que en animales se presentan diferentes variantes. En Europa la variante CTX-M-1 se ha encontrado en cepas aisladas de animales de compañía, aves de corral, ganado y cerdos (Ewers *et al.*, 2012); en Asia se ha reportado CTX-M-14 presente en animales de compañía y aves de corral (Tamang *et al.*, 2012). En América no existen muchos estudios; sin embargo, se ha reportado la presencia de CTX-M-15 en animales de compañía (Rocha-Gracia, 2008).

Se propone que los animales pueden convertirse en fuentes de infección o incluso reservorios de bacterias multirresistentes, contribuyendo a la propagación de estas bacterias, debido al contacto cercano con humanos. En estudios realizados en Europa por Ewers y col., en 2012 se obtuvo un alto índice de la presencia de CTXM-15 en animales de compañía y humanos y se propone la hipótesis que la propagación inicial de estas cepas multirresistentes se debe a que los humanos son portadores originales de *E. coli* productora de CTX-M y que por contacto directo lograron diseminarlas a los animales.

En este trabajo se realizaron ensayos para determinar si las cepas aisladas presentaban fenotipo BLEE y se encontró que 28 cepas (84.8%) presentaron el fenotipo BLEE positivo a las 3 cefalosporinas probadas (CTX, CAZ, FEP) y al betalactámico aztreonam. Por lo cual se procedió a buscar e identificar mediante PCR los genes que codifican para las BLEE tipo CTX-M-1, TEM, y SHV en los aislamientos de *E. coli*. Para observar la relación de genes de las cepas de *E. coli* que se aislaron de mascotas y sus dueños, se seleccionaron 8 cepas, las cuales eran parejas, 4 de perros y 4 de su respectivo dueño, ya que en estas parejas se observaron patrones de susceptibilidad muy similares. También se observó similitud en la presencia de genes BLEE por lo que se realizó la secuenciación de las 8 cepas para confirmar que se trataba de la misma variante en las 4 parejas. Esto fue debido a que, por falta de recursos, solo se obtuvo la secuencia del gen en un solo sentido y solo del extremo amino terminal, no obteniendo la secuencia completa del gen. Sin embargo, al realizar un alineamiento de secuencias de aminoácidos con el programa ClustalW se observó que algunas cepas tenían correspondencia con una o dos variantes del grupo de las CTX-M-1 (CTX-M-1, 15, 123) por lo que sería interesante realizar la secuenciación completa del gen para poder identificar claramente de que variante se trata.

La epidemiología de las BLEE es bastante complicada debido a que se deben de tomar muchos factores a considerar como el área geográfica, el país, el hospital, la comunidad, el hospedero y el componente final implica la transmisión de alimentos y agua, y a través del contacto directo o indirecto (persona a persona) o con animales (Carattoli, 2008). En este trabajo el 90% de los dueños reportaron que tenían un

contacto cercano y prolongado con sus mascotas. En la revisión realizada por Guardabassi y col., en 2004, se sugiere que el uso desmedido de antimicrobianos en animales contribuye a la selección de resistencia a los antimicrobianos y plantea riesgos para los humanos debido a la transmisión zoonótica de bacterias multirresistentes a través de la cadena alimentaria y la transferencia indirecta de genes de resistencia de los animales al humano.

Por ello con lo obtenido en este trabajo se sugiere que existe una probable diseminación de cepas multirresistentes mediante transmisión horizontal de genes entre cepas provenientes de perros y humanos, debido a la similitud de los resultados fenotípicos y genotípicos identificados en estas cepas.

CONCLUSIONES

- Se logró identificar y caracterizar cepas de *E. coli* multirresistentes y productoras de BLEE en muestras fecales aisladas de mascotas y dueños que asistieron el hospital de pequeñas especies de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- De las cepas aisladas se encontró que 100% de las cepas provenientes de mascotas y sus dueños fueron resistentes a cefalosporinas de tercera generación a ceftriaxona (CRO).
- Todas las cepas aisladas de *E. coli* presentaron multiresistencia.
- De acuerdo a los resultados de las PCR, 1 cepa proveniente de humano y 1 cepa proveniente de perro aisladas de *E. coli* presentaron el gen *bla*_{TEM}.
- De acuerdo a los resultados de las PCR el 100% de las cepas amplificaron con los oligonucleótidos del gen de BLEE tipo CTX-M-U, sugiriendo la presencia de alguna cefotaximasa.
- A pesar de que solo se obtuvo parcialmente la secuencia del gen, en las cepas provenientes de las 4 parejas de humano-perro se sugiere la presencia de *bla*_{CTXM-15}.
- Una sola cepa de *E. coli*, proveniente de humano presentó el gen *bla*_{SHV}.

PERSPECTIVAS

- 1.- Confirmar la presencia de CTX-M-15 mediante la secuencia del gen completo en las cepas de *E. coli*.
- 2.- Secuenciar el gen *bla*_{TEM} en las cepas de *E. coli*.
- 3.- Secuenciar el gen *bla*_{SHV} en la cepa de *E. coli*.

13. ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1 Pruebas de identificación de cepas de *E. coli*

Criterios de Cowan,s & Steel para *E. coli*

Criterios	Resultados
Forma	Bacilar
Crecimiento aerobio	+
Crecimiento anaerobio	+
Movilidad	+/-
Catalasa	+
Oxidasa	-
Fermentación de glucosa	+
Producción de ácido a partir de glucosa	+

Fundamento de pruebas bioquímicas

Agar Hierro y Triple Azúcar (TSI)

Es un medio empleado para la identificación de enterobacterias, en base a la fermentación de glucosa, lactosa, sacarosa y la producción de ácido sulfhídrico.

Agar de Hierro y Lisina (LIA)

Medio de cultivo utilizado para diferenciar microorganismo, principalmente *Salmonella spp*, basado en la descarboxilación/desminación de la lisina y producción de ácido sulfhídrico. En este medio la peptona y el extracto de levadura aportan los nutrientes para el desarrollo de la bacteria, la glucosa es el carbohidrato fermentable y la lisina el sustrato utilizado para detectar la presencia de enzimas descarboxilasa y desaminasa. El citrato de hierro y el tiosulfato de sodio son los indicadores de la producción de ácido sulfhídrico. El purpura de bromocresol es el indicador de pH, el cual es el amarillo a pH igual o menor a 2.5 y el color violeta a pH mayor o igual a 6.8.

Por la descarboxilación de la lisina, se produce cadaverina, que alcaliniza el medio y esto produce el viraje del indicador de color violeta y tiene lugar a pH ácido, por lo que es necesario que la glucosa sea previamente fermentada.

Los microorganismos que no producen la enzima lisina descarboxilasa, pero son fermentadores de glucosa, producen un viraje total del medio de cultivo color

amarillo, pero a las 24 horas de incubación se observara el pico color violeta debido al consumo de la peptona. (MacFaddin, 2003).

E. coli en este medio produce un viraje totalmente violeta debido a la descarboxilación de la lisina.

MIO (Movilidad-Indol-Ornitina)

Este medio es utilizado para la identificación de *Enterobacteriadeae* en base a su movilidad, actividad de ornitina descarboxilasa y producción de Indol.

La movilidad se observa por la presencia de turbidez en el medio o por el crecimiento que difunde más allá de la línea de inoculación.

La reacción positiva a la ornitina está dada por el púrpura de bromocresol, debido a la fermentación de la glucosa que produce reducción de pH produciendo la acidificación del medio. La presencia de acidez otorga las condiciones óptimas para la enzima ornitina descarboxilasa, el indol es producido a partir de triptófano por los microorganismos que contienen la enzima triptofanasa. Si al gregar el reactivo de Kovac o Elrich se observa un color rojo, el resultado es positivo (MacFaddin, 2003).

Citrato de Simmons

Medio utilizado para la diferenciación de *Enterobacteriadeae* en base a la capacidad de usar a citrato como única fuente de carbono y energía.

El fosforo monoamónico es la única fuente de nitrógeno y el citrato de sodio es la única fuente de carbono. Ambos componentes son necesarios para el desarrollo bacteriano. Las sales de fosfato forman un sistema buffer, el magnesio es cofactor enzimático y el azul de bromotimol es el indicador de pH que en medio alcalino vira a un color azul.

El metabolismo del citrato se realiza en aquellas bacterias que poseen la enzima citrato permeasa, a través del ciclo de tricarboxílicos, el desdoblamiento del citrato progresivamente a oxalacetato y piruvato. Este último en presencia de un medio alcalino, da origen a acidos organicos que al ser utilizados como fuente de carbono, producen carbonatos y bicarbonatos alcalinos y entonces el medio vira a un color azul y es indicativo de citrato permeasa (MacFaddin, 2003).

Medio Urea

Es un medio utilizado para diferenciar microorganismos en base a la actividad de la enzima ureasa. Se utiliza para identificar bacterias que hidrolizan urea tales como *Proteus spp*, otras enterobacterias y estafilococos.

Algunas bacterias hidrolizan la urea por medio de la enzima ureasa produciendo amoniaco y dióxido de carbono. Estos productos alcalinizan el medio haciendo virar elrojo fenol de amarillo a rojo. En este medio la fermentación de la glucosa activa la enzima ureasa, acelerando la velocidad del metabolismo en aquellos organismos que hidrolizan lentamente la urea (MacFaddin, 2003).

Agar fenilalanina

Medio de cultivo utilizado para diferenciar a *Morganella morgani* y *Proteus spp*, de la mayoría de los otros miembros de la familia *Enterobacteriadeae* en base a la presencia de la enzima fenilalanina desaminasa.

En este medio el extracto de levadura es el que aporta los nutrientes para el adecuado desarrollo bacteriano. El aminoácido fenilalanina sufre desaminación oxidativa catalizada por la enzima fenilalanina desaminasa, para producir ácido fenilpirúvico y amoniaco, la presencia del ácido fenilpirúvico se demuestra con el agregado de cloruro férrico en medio ácido, con el cual se forma un quelato de color verdoso entre el ácido fenilpirúvico y los iones de Fe^{3+} (MacFaddin, 2003).

Vogues Proskauer

Medio utilizado para la realización del ensayo de rojo de metilo y Vogues Proskauer es particularmente en las enterobacterias.

La pluripetona (es una mezcla en partes iguales de peptona de carne y peptona de caseína) aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano y la glucosa es el carbohidrato fermentable., la glucosa puede ser metabolizada por los microorganismos, a través de distintas vías metabólicas. Según la vía utilizada, se originan productos finales ácidos o productos finales neutros. Esta diferencia del metabolismo bacteriano, podría ser reconocida por la adición de indicadores como el rojo de metilo, para revelar la presencia de productos ácidos y por la adición de alfa naftol e hidróxido de potasio para evidenciar la presencia de productos finales neutros.

Vogues y Porskauer, describieron que la coloración roja que aparecía después de adicionar hidróxido de potasio a los cultivos de microorganismos en medios de glucosa, se debe a la oxidación de acetil metil carbinol a diacetilo, el cual reacciona con la peptona del medio para dar un color rojo (MacFaddin, 2003).

ANEXO 2 FORMATOS DE CAPTURA DE DATOS

CUESTIONARIO

DUEÑO

NOMBRE:

EDAD:

SEXO:

1.- ¿Se encuentra tomando algún antibiótico en la actualidad?

SI ____ nombre del antibiótico: _____ NO

2.- ¿Cursa actualmente con una infección estomacal?

SI ____ nombre del medicamento administrado: _____ NO

3.- ¿Duerme con su mascota?

SI NO

4.- Tiempo de convivencia con la mascota

MASCOTA

Nombre:

Edad:

Sexo:

1.- ¿Qué alimentos consume su mascota?

a) Croquetas b) Sobras de comida c) otros _____

2.- ¿En qué lugar duerme su mascota?

a) Cama de dueño b) Piso c) Cama especial para mascota

2.- ¿Su mascota convive con otras mascotas?

SI NO

3.- ¿Qué tipo de mascotas?

4.- ¿Con que frecuencia baña a su mascota?

a) Semanal b) Cada 15 días c) Cada mes d) Otros _____

5.- ¿En qué lugar su mascota realiza sus necesidades fisiológicas?

a) Dentro de la casa

b) Patio

c) Calle

6.- ¿Se lava las manos después de acariciar a su mascota?

SI

NO

13.2 Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO

INFORMACIÓN

¿Qué es y como se realiza?

La toma de muestra consiste en recoger una muestra biológica de heces del dueño y su mascota (Perro).

¿Para que sirve?

Para realizar un estudio microbiológico que aportará información útil sobre la presencia de la enterobacteria *Escherichia coli* multirresistente y productora de betalactamasas de espectro extendido.

Es de suma importancia conocer el mecanismo por el cual las bacterias cada vez se vuelven mas resistentes a antibióticos betalactamicos, los cuales son los mas utilizados en la actualidad por el sector salud para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

Este proyecto tiene como objetivo de estudio buscar si se encuentra la misma cepa bacteriana multirresistente en la mascota y en su dueño o se encuentran diferentes cepas; esto debido a que se ha observado que es posible presentar una correlación entre cepas que no dañan a un hospedero como en el caso de las mascotas pero que si pueden dañar al humano o viceversa y se pueden transmitir entre ambos.

Así tras haber comprendido la información recibida doy libremente mi consentimiento para la recolección y procesamiento de la muestra descrita arriba.

NOMBRE:

FIRMA:

LUGAR Y FECHA:

ANEXO 3 PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR Protocolo para purificar DNA a partir de gel de agarosa

DNA Extraction Kit #K0518 de Fermentas

Componentes del Kit:

1. Suspensión de polvo de sílica: 0.15mL de la suspensión preparada en agua.
2. Solución de unión: 8mL de solución de ioduro de sodio 6M.
3. Buffer concentrado de lavado: 1.5mL de solución concentrada de Tris, NaCl y EDTA para preparar el Buffer de lavado* *Antes de usar este kit preparar el buffer de lavado agregando 1.5mL de Buffer de Lavado Concentrado a 28.5mL de agua destilada y mezclar. Añadir 30mL de etanol al 95% (Importante: Asegurarse de que el contenido de agua en el etanol no sea mayor al 5%). El buffer preparado debe almacenarse a -20°C entre usos.
4. Buffer de Conversión TBE: 1.5mL de concentrado de sales** **Si se remueve el fragmento de DNA a partir de un gel de agarosa preparado con TBE, agregar ½ volumen de Buffer de Conversión TBE y 4.5 volúmenes de Solución de Unión en relación a la cantidad de agarosa cortada, para disolverla no es necesario agregarlo si el buffer usado para la separación electroforética no fue TBE.

NOTA: Este kit debe ser almacenado a +4°C antes de su uso. El buffer de lavado preparado debe almacenarse a -20°C y el resto de los componentes a +4°C, pero si el kit se usa esporádicamente o tiene varios usuarios pueden hacerse alícuotas de la suspensión de sílica y conservarse a -20°C. Si la suspensión pierde líquido puede adicionarse agua destilada estéril en un volumen igual al volumen del sólido.

Procedimiento: 1. Cargar la solución que contiene al DNA en un gel de agarosa y correr el gel para separar los productos de la reacción.

2. Cortar la banda de interés minimizando el tiempo de exposición a la UV tanto como sea posible y a baja longitud de onda.

3. Depositar el gel cortado en uno o dos tubos eppendorf de 1.5mL.

4. Agregar 3 volúmenes de la Solución de Unión a 1 volumen de gel: pesar el tubo vacío y con el gel y la diferencia corresponde al peso del gel, por ejemplo, si el Caracterización de resistencia a β-lactámicos y quinolonas ANEXOS 129 peso del gel es 0.15g se le agregarían 3 volúmenes de la Solución de Unión, es decir, 0.45mL=450μL.

5. Incubar de 50 a 55°C hasta disolver la agarosa (aproximadamente 15 a 20min).

6. Agregar la suspensión de sílica (5μL) y homogeneizar por vórtex unos 30s. NOTA: 2μL de sílica pueden atrapar 1μg de DNA. Para cantidades pequeñas de DNA (0.1-

2.5µg) se recomienda usar 5µL de sílica, arriba de 2.5µg de DNA se recomienda usar 2µL de sílica por cada 1µg de DNA.

7. Incubar unos 15min de 50-55°C mezclando por vórtex aprox. cada 2min.
8. Centrifugar por spin a 13,000rpm 30s a 1min para formar la pastilla y remover el sobrenadante.
9. Agregar 500µL de buffer de lavado frío, homogeneizar con punta o vórtex hasta resuspender completamente.
10. Dar un spin y desechar sobrenadante con pipeta.
11. Dejar secar la pastilla (mínimo 15min).
12. Eluir el DNA con agua estéril desionizada, resuspendiendo la pastilla con ayuda de una punta y dejando incubar de 50-55°C por unos 15-30min. Con el fin de dejar que interactúe completamente al agua con el DNA contenido en la sílica.
13. Dar un spin por 1min a 13,000rpm y remover el sobrenadante (que contiene al DNA) en un tubo nuevo, con ayuda de una pipeta, teniendo mucho cuidado de no arrastrar nada de sílica. NOTA: Para remover pequeñas cantidades de sílica se puede centrifugar por otros 30s.
14. Correr una alícuota en un gel de agarosa para determinar la cantidad de DNA por comparación con un control. NOTA: Se estima la concentración de DNA por comparación de su intensidad con un DNA estándar de un tamaño y concentraciones conocidas.

ANEXO 4

REQUERIMIENTOS PARA MANDAR A SECUENCIAR EL DNA PARA SECUENCIAR

Se debe mandar el ADN purificado, debe de ir en agua destilada (nada de buffer). La concentración de la muestra depende de si es un plásmido o es un producto de PCR aislado (no clonado); si es plásmido debe de estar a 150-200 nanogramos por microlitro, si es producto de PCR aislado se necesitan entre 20-60 nanogramos por microlitro, dependiendo del tamaño del producto, además se necesita una fotografía de una alícuota (2-3 microlitros) de los productos de PCR ya purificados corridos en un gel, junto con un marcador de peso molecular, se tiene que indicar cuantos microlitros de la muestra se cargaron en el gel, así como el tamaño aproximado del producto, en ambos casos (plásmido o producto de PCR aislado) se requieren unos 15-20 microlitros, los primers se requieren también en agua y a una concentración de 10 micromolar (10 picomolas por microlitro) y se requieren unos 20 microlitros, también se requiere la secuencia de los primers. El DNA y los primers se mandan por separado.

ANEXO 5 SECUENCIA DE PAREJAS

2H (20-340)

AGGCACCGTCACGCTGTTGTTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGG
ACGTACAGCAAAAACCTTGCCGAATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGT
GTGGCATTGATTAACACAGCAGATAATTCGCAAATACTTTATCGTGCTGATGAGC
GCTTTGCGATGTGCAGCACCAAGTAAAGTATGGCCGCGGCCGCGGTGCTGAAG
AAAAGTGAAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTG
ACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCAATGGGACGATGTCACT
GGCTGA

2P (20-300)

AGGCACCGTCACGCTGTTGTTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGG
ACGTACAGCAAAAACCTTGCCGAATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGT
GTGGCATTGATTAACACAGCAGATAATTCGCAAATACTTTATCGTGCTGATGAGC
GCTTTGCGATGTGCAGCACCAAGTAAAGTATGGCCGCGGCCGCGGTGCTGAAG
AAAAGTGAAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTG
ACCTTGTTAACTATAATCCGATTG

17H (20-300)

AGGCACCGTCACGCTGTTGTTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGG
ACGTACAGCAAAAACCTTGCCGAATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGT
GTGGCATTGATTAACACAGCAGATAATTCGCAAATACTTTATCGTGCTGATGAGC
GCTTTGCGATGTGCAGCACCAAGTAAAGTATGGCCGCGGCCGCGGTGCTGAAG
AAAAGTGAAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTG
ACCTTGTTAACTATAATCCGATTG

17P3 (20-230)

GGCACCGTCACGCTGTTGTTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGGA
CGTACAGCAAAAACCTTGCCGAATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTG
TGGCATTGATTAACACAGCAGATAATTCGCAAATACTTTATCGTGCTGATGAGCG
CTTTGCGATGTGCAGCACCAAGTAAAGTATGGCCGCGGCCGCGGTGCTGAAGA
AAAGTG

20H1(20-300)

AGGCACGTCACGCTGTTGTTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGGA
CGTACAGCAAAAACCTTGCCGAATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTG
TGGCATTGATTAACACAGCAGATAATTCGCAAATACTTTATCGTGCTGATGAGCG
CTTTGCGATGTGCAGCACCAAGTAAAGTATGGCCGTGGCCGCGGTGCTGAAGA
AAAGTGAAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTGA
CCTTGTTAACTATAATCCGATTG

20P1 (20-250)

AGGCACCGTCACGCTGTTGTTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGG
ACGTACAGCAAAAACCTTGCCGAATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGT
GTGGCATTGATTAACACAGCAGATAATTCGCAA

TACTTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGG
CCGTGGCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAAGCGAACCGAATCTG

21H (20-330)

AGGCACCGTCACGCTGTTGTTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGG
ACGTACAGCAAAAACCTTGCCGAATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGT
GTGGCATTGATTAACACAGCAGATAATTCGCAAATACTTTATCGTGCTGATGAGC
GCTTTGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGCCGCGGCCGCGGTGCTGAAG
AAAAGTGAAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTG
ACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCAATGGGACGATGTCACT
G

21P (20-320)

GTCACGCTGTTGTTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGGACGTACA
GCAAAAACCTTGCCGAATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGGCAT
TGATTAACACAGCAGATAATTCGCAAATACTTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTGC
GATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGCCGTGGCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTG
AAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTGACCTTGT
TAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGTCCGTCAAT

14. BIBLIOGRAFÍA

- Andersson, Di & Hughes,D.(2003).Persistence of antibiotic resistant bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 6(5): 452-456.
- Aslantaş,Ö.,Yilmaz,E.(2017). Prevalence and molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and plasmidic AmpC β -lactamase (pAmpC) producing *Escherichia coli* in dogs, *J Vet Med Sci.* 1024–1030.
- Ángeles,R. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Publica Mex* .44:464-475.
- Alpuche, C & Daza,C. (2002). Infecciones nosocomiales por bacterias Gram negativas resistentes a cefalosporinas de espectro extendido: asociación de dos peligrosos enemigos.*Enf Infec y Micro.* 22(4): 192-199.
- Arias, E; Torres,M; Muguercia,H; Valdés,D & Pérez,D. (1998). Carbapenémicos y monobactámicos. *ACTA MEDICA.* 8(1):66-70.
- Bauernfeind,A; Grimm,H; Schweighart,S. (1990). A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection.* 18:294-8.
- Black, J. A., K. S. Thomson, J. D. Buynak, and J. D. Pitout. (2005). Evaluation of betalactamase inhibitors in disk tests for detection of plasmid-mediated AmpC betalactamases in well characterized clinical strains of *Klebsiella* spp. *J. Clin. Microbiol.* 43:4168–4171.
- Bonomo, R & Rice,L. (1999). Inhibitor resistant class A beta-lactamases. *Front Biosci* 4,e34-41, May 15, 1999).
- Carattoli, A; Lovari, S; Franco, A; Cordaro,G; Matteo,P;Battisti,A & Superiore,I.(2005). Extended Spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome,Italy,from 2001 ro 2003. *Antimicrob Agents Chemoter.* 49(2), 833-835.
- Carvalho, A. C., Barbosa, A. V, Arais, L. R., Ribeiro, P. F., Carneiro, V. C., & Cerqueira, A. M. F. (2016). Resistance patterns, ESBL genes, and genetic relatedness of *Escherichia coli* from dogs and. *Braz J Microbiol.* 47(1), 150–158.
- Clermont,O.,Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol.* 5, 58–65.

- Clapper,W & Meade,G. (1962). Normal flora of the nose, throat and lower intestine of dogs. *J. Bacteriol.* 85(3), 643-648.
- Cué, M & Morejón,M.(1998). Antibacterianos de acción sistémica. Parte I. Antibióticos betalactámicos. *Rev Cubana Med Gen Integr.* 14 (4), 347–361.
- Conell,S; Tracz,D; Nierhaus,K; Taylor,D. (2013). Ribosomal Protection Proteins and their Mechanism of Tetracycline Resistance. *Antimicrob Agents and Chemoter.* Vol 4 (12): 3675–3681.
- Cortes-Cortés; (2012). Caracterización de la resistencia a β -lactámicos y quinolonas en aislamientos de muestras clínicas (Tesis de maestría).Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.Puebla,Pue.
- Cortés-Cortés, G; Lozano,P; Torres,C; Castañeda,M; Sánchez, GM; Alonso,CA; Lopez, L;Mayen,MG; Martínez,Y; Rocha-Gracia, Rdel C. (2016). Detection and Molecular Characterization Of *Escherichia Coli* Strains Producer of Extended – Spectrum and CMY-2 Type Beta-Lactamases, Isolated from Turtles in México. *Vector Borne Zoonotic Dis*;16(9):595-603
- Cundon,C; Ameal,A; Maubecín,E & Bentancor,A. (2016). Caracterización de cepas patógenas extraintestinales de *Escherichia coli* aisladas de perros y gatos de compañía de Buenos Aires, Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 50(3); 290-294.
- Dabanch, J. (2003). Zoonosis, *Rev Chil Infectol.* 20 (Supl 1), 47–51.
- Espinoza, E;(2017). Aislamiento e identificación de cepas de *Escherichia coli* resistentes a Betalactámicos de espectro extendido mediante aislamiento bacteriano de caninos en la zona urbana de Quito.Quito: UCE. Forbes:<https://www.forbes.com.mx/7-de-cada-10-hogares-en-mexico-tienen-una-mascota/>.
- Ewers,C; Bethe, A; Semmler,T; Guentherl,S y Wieler,H. (2012). Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC- producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, an their putative impact on public health: a global perspective. *Clin Microbiol Infect.* 18(7):646-55
- Garza-Ramos, M;Silva-Sánchez, J., & Martínez-Romero, E. (2009). Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *Salud Publica Mex.* 51 supl 3:S439-S446.
- Guardabassi, L., Schwarz, S., & Lloyd, D. H. (2004). Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *Antimicrob Agents Chemoter.* 54(2), 321–332.

- Gutierrez,A; Granados,D & Piar,N. (2007). Interaccion humano-animal características e implicaciones para el bienestar de los humanos. *Rev, colom, psicol.* 0121-5469.
- Guillèn,L; Millàn,B & Araque,M.(2014).Caracterizaciòn molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mèrida,Venezuela. *Infectio*.18(3):100-108.
- Jarlier,V., Nicolas,Mh;Fournier,G & Philippon,A. (1988). Extended broad-spectrum betalactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: Hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis*.10, 867-878.
- Kang, M., Chae, M., Yoon, J., Kim, S., Lee, S., Yoo, J., & Park, H. (2014). Antibiotic resistance and molecular characterization of ophthalmic *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs. *Journal of Vet Sci.* 15(3), 409–415.
- Karanika, S., Karantanos, T., Arvanitis,M., Grigoras, C.,& Mylonakis, E. (2017). Fecal Colonization with Extended-spectrum Beta- lactamase. Producing Enterobacteriaceae and Risk Factors Among Healthy Individuals : A Systematic Review and Metaanalysis, *Clini infes dis.* 63(3):310-8.
- Knothe,H; Shah,P; Krcmery,V; Antal,M & Mitsuhashi,S.(1983). Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin,cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*.*Infectio*.11:315-7.
- Li, X., & Plésiat, P. (2015). The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-, *Clin Microbiol Rev.* 28(2), 337–418.
- Livermore, D. M. (1995). beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews.* 8(4), 557–584.
- Ljungquist, O., Ljungquist, D., Myrenås, M., Rydén, C., Finn, M., & Bengtsson, B. (2016). Evidence of household transfer of ESBL-/pAmpC-producing Enterobacteriaceae between humans and dogs – a pilot study.*Infect Ecol Epidemiol.* 6(1), 31514.
- Maattar, S & Martínez,P. (2007). Emergencia de la resistencia antibiótica debida a las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE): detección, impacto clínico y epidemiología. *Infectio.* 11:23-25.
- MacFaddin.(2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia Clínica. 3ra edición,Mèdica Panamericana, 2003.
- Martínez, L. (2006). Mecanismos de adquisición de resistencia a los antibióticos. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 20–26(3), 172–177.

- Matsumoto, Y., Ikeda, F., Kamimura, T., Yokota, Y., & Mine, Y. (1988). Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrob Agents and Chemother.* 32(8), 1243–1246.
- Moreno, C., González, R., & Beltrán, C. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. Antimicrobial resistance mechanisms in respiratory pathogens. *Rev. otorrinolaringol. cir. cabeza cuello* .69(2), 185–192.
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J. L., & Ochoa, T. J. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 28(4), 648–56.
- Medeiros, L., Chiconi, C., Blanco, J., Martins, F., Pelayo, J., Blanco, M., Nakazato, G. (2013). Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats in Brazil, *Vet Microbiol.*166, 676–680.
- Morejón, M. (2013). Beta Lactamasas de espectro extendido. *Rev. Cub.* 52(4): 272-280.
- Monge, K. (2013). Carbapenemico: Tipos y mecanismos de resistencia bacteriana. *Rev med Costa Rica.* 20 (608): 509-605.
- Montés, J. (2001). Los animales en el arte rupestre postpaleolítico de la península ibérica. Emblemas, alegorías, epifanías y ausencias. *An Murcia.*16-17, 2001-2002, pags 37-52.
- Normand, E; Gibson, N; Reid, S; Carmichael, S & Taylor, D. (2000). Antimicrobial Resistance trends in bacterial isolates from companion-animal community practice in the U.K. *Prev Vet Med.* 46(4): 267-278.
- Porres, N. (2015). Detección y bases genéticas de Beta-lactamasas AmpC y carbapenemasas en Aislados clínicos y Comensales de Enterobacterias (Título de tesis doctoral). Universidad de la Rioja. Logroño.
- Puño-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 microbial.*166(3-4): 676-80.
- Damborg, P; Pires dos Santos, T., Moodley, A., & Guardabassi, L. (2016). Systematic Review on Global Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: Inference of Population Structure from Multilocus Sequence Typing Data. *Frontiers in Microbiology.* 7, 1599.

- Pereira, P.S., de Araujo, C.F., Seki, L.M., Zahner, V., Carvalho-Assef, A.P. & Asensi MD.(2013). Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). *J Antimicrob Chemother.* 68 (2), 312-316.
- Quintana,J; González,N; Bilbao,A; Aizpuru,F; Escobar,A; Esteban,C; San-Sebastián,J; De la Sierra,E & Thompson,A. (2006). Predictors of patient satisfaction with hospital health care. *Health Services Research.* 6:102.
- Rzewuska, M., Czopowicz, M., Kizerwetter-Świda, M., Chrobak, D., Błaszczak, B., & Binek, M. (2015). Multidrug Resistance in *Escherichia coli* Strains Isolated from Infections in Dogs and Cats in Poland (2007–2013). *The Scientific World Journal.* 2015, 408205.
- Rodríguez-Angeles, M. G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de Mex.* 44(5), 464–475.
- Rocha,G;Cortès; Lozano,P; Bello,F; Martínez,I & Torres,C. (2015). Faecal *Escherichia coli* isolates from healthy dogs harbour CTXM-15 and CMY-2 betalactamases. *Vet J.* 203(3): 315-9.
- Zarain,P; Rocha-Gracia,R &Laguna,Y. (2009). Antibióticos: uso, mecanismo de acción, de resistencia y antibioticoterapia.Puebla,Pue.México.Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Schmiedel, J., Falgenhauer, L., Domann, E., Bauerfeind, R., Prenger-Berninghoff, E., Imirzalioglu, C., & Chakraborty, T. (2014).Multiresistant extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae from humans, companion animals and horses in central Hesse, Germany. *BMC Microbiology.*14 (1), 1–13.
- Seral,C,Gude,M,Castillo,J. Emergencia de β -lactamasas AmpC plasmídicas (pAmpC ó cefamicinasas): origen, importancia, detección y alternativas terapéuticas. *Rev Esp Chemoter,* 25(2):89-99.
- Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S. M. D., & Kamal, M. A. (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J Biol Sci.* 22(1), 90–101.
- Schaufler, K., Bethe, A., Lübke-Becker, A., Ewers, C., Kohn, B., Wieler, L. H., 49 & Guenther, S. (2015). Putative connection between zoonotic multiresistant extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in dog feces from a veterinary campus and clinical isolates from dogs. *Infection Ecology & Epidemiology,* 5(1), 25334.
- Saldaña, L; Anduaga,E; Mendoza,J; Yokota,P & Del-Carpio,R. (2004). Antibióticos sistémicos en dermatología. *Dermatología Peruana;* vol. 14 (3), 161-179.

- Tafur, J; Torres, J & Villegas, M. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *CIDEIM*.12(3):224-231.
- Tamang, M., Nam, H., Jang, G., Kim, S., Chae, M., Jung, S & Lim, S. (2012). Molecular Characterization of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing and Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Stray Dogs in South Korea. *Antimicrob Agents and Chemother.* 56(5), 2705–2712.
- Tzouvelekis, L; Tzelepi, E; Tassios, P & Legakis, N. (200). CTX-M type β -lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *J Antimicrob Agents*.14 (2): 137-142).
- Valdés, D; Mugercia, H; Torres, M; Arias, E; Marín, R & Praderes, L. (1998). Penicilinas. *Acta médica*. 8(1):28-39.
- Vignoli R, Varela G, Mota MI, Cordeiro NF, Power P, Ingold E, et al. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli* strains carrying genes encoding the PER-2 and TEM-116 extended-spectrum beta-lactamases isolated from children with diarrhea in Uruguay. *J Clin Microbiol*;43: 2940-3.
- Woerther, P., Burdet, C. y Chachaty, E. (2013). Trends in Human Fecal Carriage of Extended-Spectrum β -Lactamases in the Community : Toward the Globalization of CTX-M, *Vet J*. 26(4):744–758.
- Zolezzi, F. (1997). Las enfermedades funcionales gastrointestinales y Roma III. *Rev Gastroenterol Perú*.27:177-84.