



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Medicina

Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas

Instituto de Ciencias

Licenciatura en Biomedicina

Eje de Microbiología

Título de tesis:

“Análisis fenotípico de la susceptibilidad a quinolonas en cepas de *Escherichia coli* multirresistentes y productoras de BLEE, aisladas de heces de mascotas y sus dueños”


Título a obtener:

Licenciado en Biomedicina

Alumno:

René Antonio Cuevas Bravo

Directora de tesis:

D.C. Rosa del Carmen Rocha  Gracia

Lugar de realización:

Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad

Puebla, Pue. Noviembre de 2020.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES Y ACADÉMICOS

En primera instancia quiero agradecer a mi máxima casa de estudios la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla** que en el transcurso de mi licenciatura fomentó la investigación, la creación y divulgación del conocimiento, promoviendo la inclusión y la igualdad de oportunidades. Permitiendo mi desarrollo profesional, cultural y deportivo.

A la **Facultad de Medicina** por respaldar su misión de formar profesionales de licenciatura con preparación científica, técnica, pedagógica y humanística, contribuyendo al crecimiento que he tenido como persona, estudiante y ciudadano.

Agradezco a la **Licenciatura de Biomedicina** que nos brinda la estructura académica, institucional y cultural para siempre buscar ser mejores. Desde los docentes que tuve en mi área formativa hasta las oportunidades que nos brindan de poder formar parte de instituciones como al **Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la BUAP** para cumplir de la mejor forma con nuestra área formativa, es aquí donde quiero reconocer la labor de estas instituciones ya que nos permite a todas las generaciones encontrar en ella un hogar, con instalaciones adecuadas y siempre en crecimiento, docentes muy preparados, admirables y que siempre ven por el crecimiento de los alumnos.

En especial por permitirme formar parte del **Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad** en donde encontré una familia encabezada por mi directora de tesis **D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia** y **D.C. Patricia Lozano Zarain**, quienes a todos los alumnos de servicio social, prácticas profesionales, licenciatura, maestría, doctorado y postdoctorado nos enseñan a ser un equipo, a trabajar de la mejor manera para siempre generar conocimientos y sobretodo a realizar la metodología adecuadamente.

Al Director Rafael Erazo Hernández del **Hospital para Pequeñas Especies** de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla que nos permitió acceder a la institución para realizar el muestreo necesario para este proyecto además apoyarnos con la metodología correcta para manipular a los perros que llegaban y obtener una buena muestra.

A la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrados** por el apoyo de proyectos grupales VIEP-100182644, y a **Conacyt** por el apoyo en el proyecto CB 2017-2018-A1-S-22136, responsable académica Dra. Rosa del Carmen Rocha Gracia.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

En primera instancia quiero agradecer a mis papás (Areli y René), ya que ambos siempre me han apoyado y motivado, a base de valores y ejemplos para ser una gran persona como ellos. A mis hermanitos (Mariana y Lalo) por darme ese cariño y apoyo que me mantenía fuerte lejos de casa. A mis tías y tíos (Marina, Arturo, Charito, Mellín, Gabi, Carlos, Dani, Marcela, Lili y Chava) que son como otros padres para mí, primos y primas (Dani, Brisa, Renato, Rodrigo, Santi, Paco, Jacob, Zarella, Lucia y Arturo) que siempre me hacen sentir como el hermano mayor, a mis abuelas y abuelo (Carmelita, Juanita y Mundo) porque me han apoyado y enseñado mucho en la vida. A mi novia (Egla) que fue, es y será un apoyo y motivación importante en todo momento. A Salvador Anaya Bravo por ser una inspiración y mi guardian en el cielo, se que en otras circunstancias él sería de los primeros en celebrar mi progreso.

Agradezco a toda mi generación en donde encontré amigos muy cercanos (Mauricio y Héctor) de esos que, aunque nacimos en diferentes estados pareciera que crecimos juntos, un gran equipo y pequeña familia (Team Micro) con quienes conviví mis últimos cuatrimestres aprendiendo a trabajar juntos y a ser unidos, colegas de mi generación en Fisiología que me enseñaron mucho.

Agradezco a todos los docentes de quienes no solo adquirí conocimiento, sino aprendí que la pasión es muy importante en la ciencia y si uno ama lo que hace, siempre lo transmite. En especial a la Doctora Rosy quien siempre me apoyo y siempre me recibió con una sonrisa y con los brazos bien abiertos para sentirme parte del LMHyC en donde encontré grandes ejemplos a seguir y sobre todo otra pequeña gran familia.

Por último, agradecer al equipo de handball de LOBOS BUAP y a la Asociación Poblana de Handball por permitirme desarrollarme en lo deportivo y de esta manera mantenerme firme y motivado en mi desarrollo académico. Entrenadores, compañeros, alumnos y directivos que me hicieron encontrar en Puebla un lugar al cual siempre quereee volver.

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	NOMBRE	PÁGINA
1	Clasificación de Betalactámicos en grupos según su estructura química y espectro extendido (Seija & Vignoli, 2008; Garcia <i>et al.</i> , 2010; Munita, 2017)	17
2	Clasificación de quinolonas (King, 200)	19
3	Susceptibilidad a antibióticos (CLSI, 2019)	35
4	Pruebas bioquímicas para la identificación de <i>E. coli</i>	40
5	Perfil de susceptibilidad a antibióticos en cepas de <i>E. coli</i>	41
6	Susceptibilidad a betalactámicos, quinolonas y fenotipo BLEE <i>E. coli</i>	57

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	NOMBRE	PÁGINA
1	Estructura antigénica de las enterobacterias (Romero, 2007)	13
2	Características, metabolismo y clasificación de <i>E. coli</i> (Rodríguez-Angeles, 2002; Siever et al., 2017)	15
3	Estructura base de las quinolonas	18
4	Betalactámicos y betalactamasas de espectro extendido	21
5	Mecanismos de resistencia a quinolonas	22
6	Antecedentes específicos	25
7	Esquema de trabajo	32
8	Distribución de sensidiscos para susceptibilidad de antibióticos y fenotipo BLEE	36
9	Fenotipo de <i>E. coli</i> en agar Mac Conkey, Levine, TSA y en pruebas bioquímicas	38
10	Comparación de fenotipo de susceptibilidad a los antibióticos entre <i>E. coli</i> aislada de mascotas y sus dueños en cepas 1H y 1P	48
11	Comparación entre el porcentaje de susceptibilidad a los antibióticos entre <i>E. coli</i> aislada de mascotas y sus dueños en cepas 1H y 1P	48
12	Comparación de fenotipo de susceptibilidad a los antibióticos entre <i>E. coli</i> aislada de mascotas y sus dueños en cepas 2H y 2P	49
13	Comparación entre el porcentaje de susceptibilidad a los antibióticos entre <i>E. coli</i> aislada de mascotas y sus dueños en cepas 2H y 2P	49

14	Comparación de fenotipo de susceptibilidad a los antibióticos entre <i>E. coli</i> aislada de mascotas y sus dueños en cepas 3H y 3P	50
15	Comparación entre el porcentaje de susceptibilidad a los antibióticos entre <i>E. coli</i> aislada de mascotas y sus dueños en cepas 3H y 3P	50
16	Comparación de fenotipo de susceptibilidad a los antibióticos entre <i>E. coli</i> aislada de mascotas y sus dueños en cepas 12H* y 12P2*	51
17	Comparación entre el porcentaje de susceptibilidad a los antibióticos entre <i>E. coli</i> aislada de mascotas y sus dueños en cepas 12H* y 12P2*	51
18	Comparación de fenotipo de susceptibilidad a los antibióticos entre <i>E. coli</i> aislada de mascotas y sus dueños en cepas 17H y 17P3	52
19	Comparación entre el porcentaje de susceptibilidad a los antibióticos entre <i>E. coli</i> aislada de mascotas y sus dueños en cepas 17H y 17P3	52
20	Comparación de fenotipo de susceptibilidad a los antibióticos entre <i>E. coli</i> aislada de mascotas y sus dueños en cepas 20H* y 20P*	53
21	Comparación entre el porcentaje de susceptibilidad a los antibióticos entre <i>E. coli</i> aislada de mascotas y sus dueños en cepas 20H* y 20P*	53
22	Comparación de fenotipo de susceptibilidad a los antibióticos entre <i>E. coli</i> aislada de mascotas y sus dueños en cepas 21H y 21P	54
23	Comparación entre el porcentaje de susceptibilidad a los antibióticos entre <i>E. coli</i> aislada de mascotas y sus dueños en cepas 21H y 21P	54
24	Fenotipo BLEE y susceptibilidad a antibióticos	55

ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA	NOMBRE	PÁGINA
1	Total de muestras obtenidas	37
2	Crecimiento de cepas de <i>E. coli</i> en medio Mac Conkey + CTX	39
3	Susceptibilidad a antibióticos en cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de muestras fecales de personas y mascotas.	44
4	Susceptibilidad a antibióticos en cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de muestras fecales de personas.	44
5	Susceptibilidad a antibióticos en cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de muestras fecales de mascotas.	45
6	Fenotipo BLEE en cepas de <i>E. coli</i>	56

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	grados Celsius
AAC(6')-Ib-cr	variante de la enzima aminoglucósido acetiltransferasa
ADN	ácido desoxirribonucleico
AMC	amoxicilina/ácido clavulánico
AMP	ampicilina
AmpC	serín-betalactamasas pertenecientes al grupo 1
AN	amikacina
ARN	ácido ribonucleico
AZT	aztreonam
β-lactamasas	betalactamasas
β-lactámicos	betalactámicos
BHI	agar infusión cerebro-corazón
BLEE	betalactamasas de espectro extendido
C _{1/2}	concentración 1 o 2
CAZ	ceftazidima
CEP	cefalotina
CICM	Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas
CHL	cloranfenicol
CIP	ciprofloxacina
CIT	citrato
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CRO	ceftriaxona
CTX	cefotaxima
CTX-M	enzima aislada de “cefotaximasa variante de Munich”
DAEC	<i>Escherichia coli</i> adherencia difusa
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
FEN	fenilalanina
FEP	cefepime
FOX	cefoxitina
GEN	gentamicina
<i>gyrA</i>	gen que codifica una subunidad de la ADN polimerasa
ICUAP	Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
IMP	imipenem
ISSSTE	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
LB	Luria Bertani
LIA	agar hierro lisina
LMHyC	Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad
LPS	lipopolisacáridos
MDR	Multidrogorresistentes

MEM	meropenem
µg/mL	microgramos sobre mililitros
µg/µL	microgramos sobre microlitros
MIO	Movilidad Indol Ornitina
mL	mililitros
MNEC	<i>Escherichia coli</i> asociada a meningitis
MR-VP	Rojo de Metilo-Voges Proskauer
NaCl	cloruro de sodio
NAL	ácido nalidíxico
NO ₂	dióxido de nitrógeno
NO ₃	nitrato
ONU	Organización de las Naciones Unidas
Oqx A/B	bomba de eflujo de tipo división de nodulación de resistencia a múltiples drogas subunidad A y B
OXA	enzimas aisladas de “oxacilinasas”
<i>parC</i>	gen que codifica una subunidad de la topoisomerasa IV
PBP	proteínas de unión a penicilina
PCR	reacción de cadena de la polimerasa
QepA	transportador de fluoroquinolonas perteneciente a la superfamilia de facilitadores principales
Qnr	proteínas de repetición de pentapéptidos
QRDR	región determinante de resistencia a quinolonas
SHV	enzimas aisladas de “Sulfhidril Variable”
<i>Spp</i>	Especies
SSI	Solución Salina Isotónica
STR	estreptomicina
TE	tetraciclina
TEM	enzimas aisladas de “Temoniera”
TMP/STX	trimetoprim-sulfametoxazol
TSA	agar de soya y tripticaseína
TSI	agar hierro triple azúcar
UFC	unidades formadoras de colonias
UNICEF	Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatógena
V _{1/2}	volumen 1 o 2
VIEP	Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado
vol/vol	relación volumen-volumen

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE GRÁFICAS	6
LISTA DE ABREVIATURAS	7
1. RESUMEN	11
2. INTRODUCCIÓN	12
3. MARCO TEÓRICO	12
3.1. Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	12
3.2. <i>Escherichia coli</i>	14
3.3. Antibióticos	16
3.4. Betalactámicos	17
3.5. Quinolonas	18
3.6. Resistencia a antibióticos	19
3.7. Resistencia a betalactámicos	20
3.8. Resistencia a quinolonas	22
4. ANTECEDENTES	23
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
6. JUSTIFICACIÓN	26
7. OBJETIVOS	27
7.1. Objetivo general	27
7.2. Objetivos específicos	27
8. HIPÓTESIS CIENTÍFICA	27
9. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	27
9.1. Diseño del estudio	27
9.2. Ubicación espacio-temporal	28
9.3. Muestreo	28
9.3.1. Definición de la unidad poblacional	28
9.3.2. Selección de la muestra	28

9.3.3. Criterios de selección de las unidades de muestreo	29
9.3.3.1. Criterios de inclusión	29
9.3.3.2. Criterios de exclusión	29
9.3.3.3. Criterios de eliminación	29
9.4. Diseño y tipo de muestreo	30
9.5. Tamaño de la muestra	30
9.6. Definición de las variables y escalas de medición	30
9.7. Método y recolección de datos	30
9.8. Recursos humanos	31
9.9. Recursos materiales	31
9.10. Recursos financieros	31
9.11. Bioética	32
10. MATERIAL Y MÉTODOS	32
10.1. Estrategia de trabajo	32
11. RESULTADOS	33
12. DISCUSIÓN	59
13. CONCLUSIÓN	63
14. PERSPECTIVAS	64
15. ANEXOS	65
16. BIBLIOGRAFÍA	78

1. RESUMEN

Escherichia coli es una enterobacteria que evoluciona día con día y dentro de ese proceso ha desarrollado mecanismos de resistencia a antibióticos para su sobrevivencia en distintos ecosistemas y hospederos. Aunado a esto, el mal uso de antibióticos en la comunidad, ha permitido la aparición de cepas multidrogorresistentes en humanos y animales.

En este estudio, a partir de una población de 100 muestras obtenidas mediante hisopado rectal en perros (19 cepas) y muestras de heces de sus respectivos dueños (13 cepas), se aislaron 32 cepas de *Escherichia coli* presuntamente resistentes a CTX. Se analizó la susceptibilidad hacia 18 antibióticos de diferentes familias, así como la producción del fenotipo BLEE. Se observó que el 97% de las cepas de ambas poblaciones mostró multidrogorresistencia (MDR) y en particular todas las cepas de origen humano fueron MDR, mientras que en las cepas de origen animal se observó en el 95%. El 67% de las cepas de *E. coli* fueron resistentes a betalactámicos, fenotipo BLEE positivo y resistentes a quinolonas. 7 cepas (54%) aisladas de humanos y 15 cepas (94%) aisladas de perros con fenotipo BLEE positivo mostraron resistencia a quinolonas. Se obtuvieron 7 parejas de cepas de *E. coli* aisladas de la mascota y su respectivo dueño, de estas, 5 parejas obtuvieron un porcentaje mayor al 60% de similitud de características fenotípicas de susceptibilidad a antibióticos. La pareja de cepas de *E. coli* 20H* y 20P2* mostró un 89 % de similitud en el fenotipo de susceptibilidad a antibióticos, mientras que la pareja conformada por las cepas 12H* y 12P2* obtuvo un 94%; ambas parejas presentaron un fenotipo BLEE positivo y resistencia a quinolonas.

En la medicina humana y veterinaria continúan siendo los betalactámicos y las quinolonas los antibióticos de elección, usados para el tratamiento de infecciones causadas por enterobacterias; por ende, se puede ejercer en las bacterias la posibilidad de desarrollar mecanismos de resistencia a dichos antibióticos, como se detectó en este estudio. El análisis fenotípico de susceptibilidad a antibióticos en cepas de *E. coli* aisladas de perros sanos y sus dueños, realizado en este estudio, nos permitió apreciar que la resistencia a quinolonas, la producción de BLEE y la MDR es elevada en ambos hospederos. Además, a pesar de ser un número bajo de cepas, se demostró la relación entre cepas de *E. coli* MDR aisladas de perros y sus dueños, sugiriendo que la convivencia estrecha entre humanos y mascotas y los hábitos de ambos, podrían ser factores importantes para la diseminación de la resistencia bacteriana entre ambas especies, a través del tránsito de bacterias MDR entre microbiomas intestinales,

poniendo en riesgo a humanos y animales susceptibles frente a infecciones futuras.

PALABRAS CLAVES: quinolonas, BLEE, multidrogorresistencia, hospedero, fenotipo.

2. INTRODUCCIÓN

3. MARCO TEÓRICO

Los microorganismos han existido en la tierra por más de 3.8 billones de años y han demostrado su gran diversidad genética y metabólica. Son un componente esencial de la biosfera y juegan un papel importante en el mantenimiento de ecosistemas. Se piensa que componen el 50% de la biomasa viva. Estos organismos celulares se han agrupado en dos tipos, según las características de su núcleo: procariotas y eucariotas. Dentro del reino procariota se incluye a las bacterias (Byarugaba, 2010).

Familia *Enterobacteriaceae*

La familia *Enterobacteriaceae* está conformada por bacilos gramnegativos de 1.0 a 6.0 micrómetros, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos. Muchas especies forman cápsula, algunos tienen movilidad por flagelos, la mayoría produce pili y fimbrias, ninguna especie produce esporas, algunas especies reducen los nitratos a nitrito y fermentan a la glucosa con formación de ácido y algunas especies también producen gas. Todas son catalasa y oxidasa positivo (Cabello, 2007).

En las bacterias gramnegativas pertenecientes a esta familia la envoltura celular está formada por una estructura multilaminar. La membrana citoplasmática consiste en una doble capa de fosfolípidos que regula el paso de nutrientes, macromoléculas y metabolitos. La capa externa está compuesta de un peptidoglucano delgado junto con un espacio periplásmico que consta de una gran concentración de proteínas. La membrana externa está compuesta por otra doble capa de fosfolípidos, incluyendo lipopolisacáridos (LPS), lipoproteínas (fijadas al peptidoglucano), proteínas formando poros (proteínas multiméricas que facilitan la permeabilidad de la membrana) y otras proteínas (Rodríguez, 2010).

Toda la familia taxonómica *Enterobacteriaceae* ha sido estudiada y clasificada por Ewing y Edward, ampliada por Brenner y cols., actualmente se están agregando con mucha frecuencia nuevas especies y géneros (Cabello, 2007). Reciben su nombre por la localización común

que los caracteriza por ser saprofitos en el tracto digestivo, aunque se trata de bacterias ubicuas, que se encuentran de forma universal en el suelo, agua y en la vegetación, también forman parte de la microbiota normal de muchos animales además del hombre (Rodríguez, 2010).

Algunas especies se han adaptado al ser humano y provocan disbiosis por lo que se consideran entonces como patógenos primarios tal es el caso de *Shigella* spp., *Yersinia pestis* y algunas especies del género *Salmonella*, y otras que aun siendo parte de la microbiota del ser humano pueden comportarse como patógenos oportunistas como son: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Citobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Serratia* spp, entre otras (Fariñas & Martínez, 2013).

Las designaciones de género y especie en las enterobacterias se basan en las características fenotípicas, como su metabolismo (fermentación de carbohidratos y desdoblamiento de aminoácidos) y a partir de su estructura antigénica (Merino & Lösch, 2014); la cual resulta muy compleja, se conocen: antígeno “O” o somático (el cual es parte de un lipopolisacárido de la pared celular), antígeno “K” o capsular (presente en bacterias capsuladas como *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli*), antígeno “H” o flagelar (proteico y presente solo en especies móviles) y antígeno “F” o fimbriar (de naturaleza proteica y presente en fimbrias) (Figura 1) (Romero, 2007).

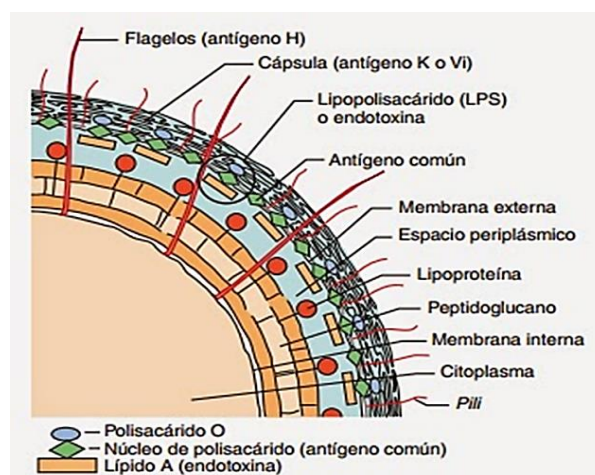


Figura 1. Estructura antigénica de las enterobacterias (Romero, 2007).

Conocer el tipo de antígeno presente en la bacteria es útil para hacer la subdivisión de las especies en múltiples serotipos, los cuales se expresan con una letra y un número del antígeno

especifico correspondiente, como el serotipo O157:H7 de *E. coli*, la causante de muchos episodios epidémicos de infecciones transmitidas por alimentos. Muchas especies carecen de cápsula, de flagelos o de ambos. Pero en los últimos años se han utilizado comparaciones de homología de ADN y ARN ribosomal para validar estas relaciones y establecer nuevas (Ryan & Ray, 2011).

Se conocen más de 30 géneros diferentes, muchos de estos han sido sometidos a análisis mediante técnicas de Biología Molecular, estudiando la homología de sus ADN y con frecuencia se aíslan a partir de muestras clínicas humanas. Los géneros de mayor importancia clínica son: *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* y *Yersinia* (Merino & Lösch, 2014).

Escherichia coli

Escherichia coli es una bacteria anaerobia facultativa, en forma de bacilo gramnegativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*; esta bacteria está ampliamente distribuida en el medio ambiente y forma parte de la microbiota intestinal natural de los animales y del ser humano, pero eso no evita que puedan actuar como agentes oportunistas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, el más conocido es diarrea.

Así mismo es una de las especies de enterobacterias más estudiadas en el mundo y que ha aportado gran información a la Microbiología, y Biología Molecular. Fue el pediatra alemán-austriaco Theodor Escherich quien en 1895 aisló esta bacteria de muestras fecales provenientes de niños y la denominó *Bacterium coli*. Con el paso del tiempo otros investigadores retomaron su descubrimiento, Castellani junto con Chalmers propondrían el nombre de *Escherichia coli*, el cual fue aceptado en 1958; Edwards y Ewing establecieron su comportamiento metabólico y sería Orskov en colaboración con Kauffman, quienes definieron su composición antigénica (Barreto, 1997; Farrow *et al.*, 2015).

Fisiológicamente es una bacteria versátil que se adapta dependiendo de las características del hábitat y llega a crecer en medios de cultivo con glucosa como única fuente de carbono, en presencia o ausencia de oxígeno y bajo condiciones anaerobias, ya que utiliza NO_2 y NO_3 o fumarato mediante procesos respiratorios de transporte de electrones y por medio de la

fermentación pueden generar ácidos y gas como producto final. Su versatilidad le ayuda a adaptarse en hábitats anaerobios (intestino) y aerobio (extraintestinal) (Lopardo, 2017).

En el tracto intestinal de animales y humanos se ha observado una comunidad compleja de microorganismos, que forman parte de su microbiota, la cual aporta cualidades a su fisiología y metabolismo. El 99% de las células bacterianas presentes en el intestino de humanos y animales son bacterias miembros del filo *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria*. *E. coli* es una de las especies comensales más abundantes, estas cepas son diversas y se diferencian de las patógenas por su filogenética. De esta manera se clasifican en grupos principales, siendo los grupos A y B1 los de baja virulencia, y los grupos B2 y D los que contienen genes de virulencia responsables de la colonización, invasión, adherencia y evasión del sistema inmune (Karami *et al.*, 2006; Becker *et al.*, 2011).

Para el estudio de la especie, *E. coli* se ha agrupado según su relación con el huésped en: cepas comensales, intestinales y extraintestinales. Por lo tanto, se ha clasificado a las cepas en grupos o patotipos, según sus mecanismos de patogenicidad, y cuadro clínico (Figura 2). Se conoce que los patotipos intestinales son: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y con adherencia difusa (DAEC). Y los patotipos extraintestinales son: uropatógena (UPEC) y asociada a meningitis (MNEC) (Rodríguez-Angeles, 2002; Siever *et al.*, 2017).

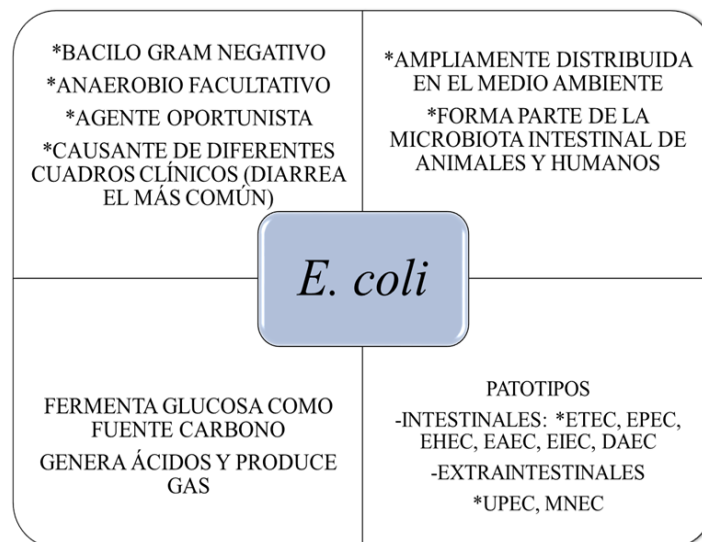


Figura 2. Características, metabolismo y clasificación de *E. coli* (Rodríguez-Angeles, 2002; Siever *et al.*, 2017).

Antibióticos

El comienzo de una era revolucionaria en el tratamiento de enfermedades infecciosas se dio con el descubrimiento de los efectos curativos de sustancias como el colorante rojo de Prontosil (precursor de las sulfonamidas) en 1935 y el descubrimiento de la penicilina por Fleming en 1929, así como su posterior desarrollo por Florey en 1940. Louis Pasteur y Robert Koch propusieron que los microorganismos desarrollaban mecanismos para sobrevivir a la competencia impuesta por sus oponentes en un hábitat. Selman Waksman en 1942 utilizó por primera vez el término de “antibiótico” (contra la vida) para definir a la sustancia producida por microorganismos, que les permite inhibir el crecimiento o matar a otros microorganismos. Este término se utiliza para definir un grupo heterogéneo de sustancias con características farmacocinéticas y farmacodinámicas específicas (Seija & Vignoli, 2008; Solberg, 2013).

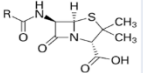
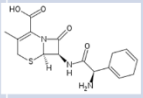
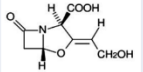
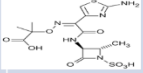
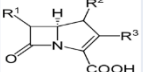
En la actualidad los antibióticos se clasifican por su origen, forma de acción, espectro de acción, mecanismo de acción y estructura química:

- Por su origen existen antibióticos naturales, sintéticos y semisintéticos.
- Por su forma de acción se puede describir a los agentes antimicrobianos como bacteriostáticos y bactericidas. Los primeros inhiben el crecimiento de la bacteria, auxiliándose del sistema inmunitario para su eliminación y los segundos son capaces de matar las bacterias con o sin la asistencia del sistema inmune del hospedero.
- Según el espectro de acción, se clasifican con relación al tipo de microorganismos que inactivan y se conocen como antibióticos de amplio espectro, de espectro menos amplio o intermedio y de espectro bajo o corto.
- Por los mecanismos de acción de los agentes antimicrobianos se pueden organizar basándose en la estructura de la bacteria o la función que el agente afecta. Los mecanismos de acción mejor descritos son: inhibición de la síntesis de peptidoglucano, proteínas, de ácidos nucleicos, de metabolismo de folato y de la estabilidad de la membrana celular.
- Por su estructura química se clasifican en: betalactámicos, macrólidos, aminoglucósidos, glucopéptidos, sulfonamidas, quinolonas, tetraciclinas,

cloranfenicoles, rifampicinas, polipéptidos y nitroimidazoles (Seija & Vignoli, 2008; Byarugaba, 2010).

❖ Betalactámicos

Los betalactámicos son antibióticos que actúan a nivel de la síntesis de pared celular, su estructura química está dada por un anillo de tiazolidina, un anillo betalactámico y una cadena lateral. Estos antibióticos tienen un efecto bactericida sobre bacterias en crecimiento. Ello se debe a que, al inhibir determinados pasos del ciclo de síntesis y ensamblaje del peptidoglucano, provocan la acumulación de precursores de dicha biomolécula, lo que a su vez desencadena la activación de proteínas que actúan como lisinas que degradan al peptidoglucano y finalmente provocan la lisis celular. Estos antibióticos tienen como sitio de acción a enzimas con actividad transglucosidasa o transpeptidasa, conocidas como proteínas de unión a penicilina (PBP por sus siglas en inglés) (Seija & Vignoli, 2008; García *et al.*, 2010; Munita, 2017). Los betalactámicos se han clasificado en 5 grupos, como se muestra a continuación (Tabla 1):

TABLA 1. CLASIFICACIÓN DE BETALACTÁMICOS EN GRUPOS SEGÚN SU ESTRUCTURA QUÍMICA Y ESPECTRO DE ACCIÓN.						
NOMBRE DEL GRUPO	AÑO DE DESCUBRIMIENTO	MICROORGANISMO	BACTERICIDA	BACTERIOSTÁTICO	ESTRUCTURA QUÍMICA	EJEMPLOS
PENICILINA	1928	<i>Penicillium chrysogenum</i>	X			-Oxacilina -Amoxicilina
CEFALOSPORINAS	1948	<i>Cephalosporium acremonium</i>	X			Se clasifican en 4 generaciones según su espectro de acción: - Primera: Cefalotina - Segunda: Cefoxitina - Tercera: Cefotaxima - Cuarta: Cefepime
INHIBIDORES DE BETALACTAMASAS	1976	<i>Streptomyces clavuligerus</i>		X		- Ácido clavulánico - Tazobactam - Sulbactam
MONOBACTÁMICOS	1981	<i>Chromobacterium violaceum</i>	X			- Aztreonam
CARBAPENÉMICOS	1985	<i>Streptomyces cattleya</i>	X			- Imipenem - Meropenem - Tienamicina

(Seija & Vignoli, 2008; García *et al.*, 2010; Munita, 2017)

❖ Quinolonas

Grupo de antimicrobianos bactericidas que provienen del ácido 4-oxo-1,4 dihidroquinoleína (Figura 3), como estructura base, que penetra en las bacterias donde forman complejos con enzimas diana (ADN girasa y topoisomerasa IV).

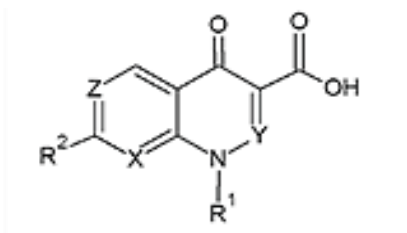


Figura 3. Estructura base de las quinolonas (Medina, 2014).

Penetran en la bacteria por porinas, canales acuosos de la membrana externa, por medio de un transportador de membrana. Dado que desestructuran los enlaces entre los lipopolisacáridos de membrana, provocan que haya un aumento de la permeabilidad de la pared celular. Para lograr entender el mecanismo de acción de las quinolonas se deben describir a las topoisomerasas, que son enzimas diferentes, pero se relacionan entre sí. La ADN girasa (topoisomerasa II) y la topoisomerasa IV inducen el enrollamiento negativo del ADN y se unen a las cadenas sencillas de ADN resultantes durante la replicación a través de enlaces covalentes que forma entre el sitio activo del residuo de tirosina y el extremo 5' de la cadena de ADN, manteniendo así su integridad y formando un complejo binario: enzima-ADN. Una vez formado este complejo, la quinolona se une en el sitio activo para así formar el complejo ternario ADN-enzima-quinolona, el cual estará dado por la unión del ion magnesio, el grupo serina y los residuos de hidrógeno expuestos.

El resultado de la formación de este complejo se refleja en la poca eficacia que tendría ahora la maquinaria encargada de la síntesis de ADN y en el daño a la integridad del mismo, al dejarlo expuesto a otras moléculas. Por lo tanto, este grupo de antibióticos tiene una acción bactericida. Según su espectro de acción se han desarrollado cuatro generaciones de estos antibióticos, las cuales difieren en sus grupos radicales y la adición de elementos como el Flúor (Tabla 2) (Aldred *et al.*, 2014; Duse *et al.*, 2015; Correia *et al.*, 2017).

TABLA 2. CLASIFICACIÓN DE QUINOLONAS		
GENERACIÓN	AGENTES	ESPECTRO ANTIMICROBIANO
PRIMERA	Ácido Nalidíxico 1960 Cinoxacino	Gram-negativos (exceptuando <i>Pseudomonas</i>)
SEGUNDA	Norfloxacino 1986 Levofloxacino 1997 Enoxacino 1992 Ofloxacino 1991 Ciprofloxacino 1987	Gram-negativos (incluido <i>Pseudomonas</i>), algunos Gram-positivo (incluidos <i>Staphylococcus aureus</i> pero no <i>Streptococcus pneumoniae</i>).
TERCERA	Esparfloxacino Gatifloxacino 1999 Enrofloxacino Moxifloxacino 1999	Gram-positivos (<i>S. pneumoniae</i> sensible y resistente a penicilina)
CUARTA	Trovafloxacino Gemifloxacino 2000 Clinafloxacino Garenoxacino (QNF)	Incluye diversos microorganismos anaerobios (King, 2000)

Resistencia a antibióticos

Los agentes antimicrobianos son un grupo heterogéneo de sustancias con diferencias en su comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ya que actúan selectivamente en las funciones de la bacteria con el mínimo de reacciones o sin afectar las funciones fisiológicas del huésped. Es así como el descubrimiento, comercialización y administración rutinaria de antibióticos que se establecen para tratar infecciones bacterianas, ha revolucionado la medicina moderna y ha cambiado el paradigma terapéutico tanto en hospitales como en la comunidad.

Los antibióticos se convirtieron en el tratamiento médico más importante para el desarrollo de procedimientos médicos complejos, como en los quirúrgicos de vanguardia, en trasplante de órganos y en el manejo de pacientes con cáncer, entre otros (Munita, 2017).

La resistencia a antibióticos ocurre cuando la bacteria es capaz de mutar en respuesta al uso de un fármaco, y así evitar que dicha sustancia tenga un efecto dañino para ella. Es la bacteria quien genera resistencia a los antibióticos, y no el ser humano o los animales, provocando que sea más difícil tratar infecciones. La resistencia a antibióticos es uno de los riesgos más urgentes en nuestra época, que a nivel mundial amenaza a la salud, el desarrollo y seguridad alimentaria. Es por ello que en la última década se han realizado campañas de concientización del uso de antibióticos y es la Organización Mundial de la Salud quien, junto con otras instancias internacionales como la ONU o la UNICEF, nacionales como ISSSTE, Secretaría de Salud e IMSS, organismos regionales y municipales; los encargados de concientizar a la

población y de tomar cartas en el asunto ante esta problemática que ha costado muchas vidas y que ha sido la misma población la que ha provocado su incidencia (Bachelet, 2019).

Resistencia a betalactámicos

Los mecanismos de resistencia a betalactámicos incluyen: disminución de la permeabilidad (que se asocia con la disminución de la expresión de porinas), modificación del sitio blanco de acción, formación de genes mosaico (por incorporación de fragmentos de material genético de otro microorganismo) generado por recombinación homóloga y transformación (genes en parche que se componen de la información existente y la recién añadida), y la hidrólisis enzimática que implica la inactivación de betalactámicos en consecuencia de la acción de enzimas como las betalactamasas (mostrando una gran plasticidad de la genética bacteriana). *E. coli* tiene diversos mecanismos de resistencia a antibióticos específicos y la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) es uno de los más importantes, debido a que los β -lactámicos son usados comúnmente en pacientes infectados por enterobacterias. Los microorganismos tienen más de 300 subtipos de β -lactamasas y la mayoría de ellos codifican las enzimas TEM, CTX, OXA o SHV que son las más comunes en enterobacterias. La resistencia también se da por la producción de β -lactamasas codificadas por plásmidos (AmpCs) (Seija & Vignoli, 2008; Korzeniewska *et al.*, 2013).

Una gran cantidad de estudios han demostrado la relación entre la multiresistencia en enterobacterias con la presencia de β lactamasas adquiridas, en especial las β lactamasas de espectro extendido, carbapenemasas y cefamicinasas (enzima de clase C). En España se comenzó a describir a las enterobacterias productoras de BLEE en 1988, poco después de su detección inicial en Francia y Alemania. Las especies *K. pneumoniae* y *E. coli* responsables de brotes nosocomiales en grandes hospitales, han sido de gran importancia cuando se habla de la producción de BLEE. No obstante, en los últimos años se ha dado gran relevancia a las infecciones de origen estrictamente comunitario, en especial por *E. coli* y otras especies como *Enterobacter spp.*, *Salmonella* y *P. mirabilis* (Fariñas & Martínez, 2013).

Las BLEE son una familia de enzimas que hidrolizan y causan resistencia a la mayoría de β -lactámicos, incluyendo penicilinas, monobactámicos y cefalosporinas (Figura 4).

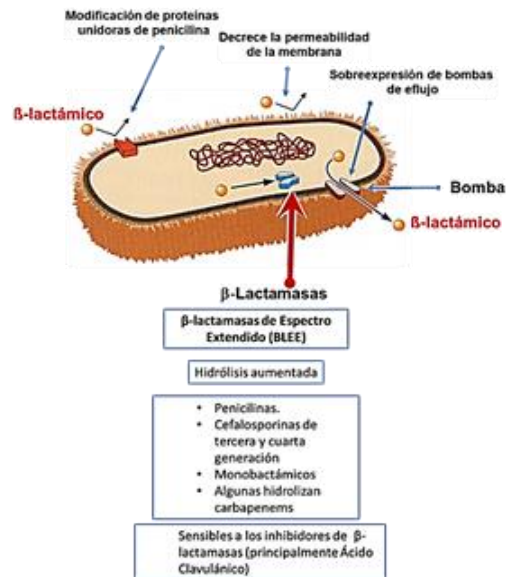


Figura 4. Betalactámicos y betalactamasas de espectro extendido

Frecuentemente las bacterias productoras de BLEE son resistentes a otros antibióticos como quinolonas, trimetoprima con sulfametoxazol y aminoglucósidos (Peralta *et al.*, 2012). Ya que la presencia de la familia de enzimas BLEE en enterobacterias se muestra en continuo crecimiento, se identifican de acuerdo a sus características genotípicas y funcionales. Lo anterior ha permitido que se desarrolle la clasificación hecha por Bush, Medeiros y Jacob y su relación con la clasificación molecular de Ambler para conocer la distribución y organización de dicha familia. Las BLEE comunes derivan de las β -lactamasas pertenecientes al grupo 2b, las cuales poseen actividad de penicilinasas y son, con frecuencia, inhibidas por el ácido clavulánico. Además, este grupo se subdivide en 2be, clase molecular A. Actualmente se conocen 249 variantes de la enzima TEM y 244 derivadas de SHV (Naas *et al.*, 2020). Se conocen otros tipos de β -lactamasas capaces de hidrolizar a la ceftazidima, otras como cefotaximasas o CTX-M y ciertas oxacilinasas del grupo 2d, clase molecular D. Las cepas que producen BLEE son resistentes a todos los antibióticos β -lactámicos con la excepción de las carbapenémicos, cefamicinas y las combinaciones de β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasas (Delfín & Almanza, 2010; Naas *et al.*, 2020).

Resistencia a quinolonas

Las quinolonas constituyen un importante grupo de antibióticos usados en el tratamiento de una gran variedad de infecciones. El amplio uso de estos agentes ha llevado a una resistencia severa a fluoroquinolonas, la cual usualmente está dada por la sustitución de nucleótidos en la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR) de los genes de ADN girasa y la topoisomerasa IV o de mecanismos que reducen la concentración citoplasmática de dicha droga por el transporte activo de quinolonas fuera de la célula a través de proteínas transmembranales, o por la combinación de ambos mecanismos. La resistencia a quinolonas mediada por plásmidos fue reportada por primera vez en Estados Unidos en 1994, al estudiar una cepa de *K. pneumoniae*. Con el descubrimiento de una proteína involucrada en la resistencia llamada proteína de resistencia a quinolona (llamada después QnrA1), se estableció que protege a la bacteria (a la ADN girasa y topoisomera IV) de la acción del antibiótico. Actualmente se han identificado 6 familias de proteínas Qnr (A, B, C, D, S y VC) (Yanat *et al.*, 2017). Otro mecanismo reportado es la modificación de ciertas quinolonas, debida una variación dada por la enzima aminoglucósido acetiltransferasa AAC (6')-Ib, ya que esta enzima es capaz de modificar la estructura de la ciprofloxacina y la norfloxacina mediante una N-acetilación del nitrógeno, que forma parte del grupo amino del sustituyente piperanzil de estas quinolonas, por lo que se le denomina AAC(6')-Ib-cr. Y en 2007 se identificó un tercer mecanismo conocido como bombas de eflujo, las cuales son proteínas transportadoras de membrana, por ejemplo, la bomba QepA y OqxA/B (Figura 5) (Alouache *et al.*, 2014; Yanat *et al.*, 2017).

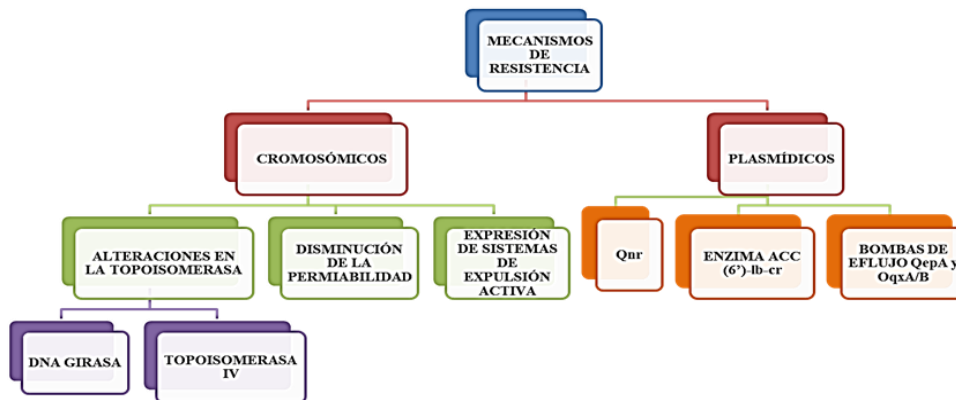


Figura 5. Mecanismo de resistencia a quinolonas.

4. ANTECEDENTES

El uso indiscriminado de antibióticos ha aportado una significativa presencia de ellos en el medio ambiente, promoviendo resistencia a microorganismos por selección, mutación y recombinación. La contaminación de ambientes acuáticos, por ejemplo, es un instrumento de diseminación de resistencia bacteriana que puede llegar hasta los humanos y/o animales por contacto con alimentos (Alaouche *et al.*, 2014).

Microorganismos con resistencia a antibióticos han sido reportados como los causantes de alrededor del 20-70% de las infecciones nosocomiales (Duede *et al.*, 2017).

Un estudio en Corea mostró una tasa de resistencia a las fluoroquinolonas superior al 20%, que es el límite de la tasa de resistencia local recomendada por la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (IDSA) para el tratamiento empírico (Lee *et al.*, 2017).

En 2013 científicos pertenecientes al Instituto de Ciencias Biomédicas y la Clínica Veterinaria de la Universidad de Porto, Portugal; realizaron un proyecto que evaluó las características genotípicas y fenotípicas de cepas aisladas de mascotas y sus dueños que se encuentran en cohabitación e incluso tomaron muestras de superficies del hogar, en la que se lleva a cabo dicha cohabitación. Seleccionaron una pareja de la tercera edad con antecedentes de tratamiento constante a antibióticos, sus mascotas que fueron diagnosticadas con una infección urinaria reciente (un perro y un gato), su nieto de 2 años de edad que convive con las mascotas de forma cotidiana y las superficies del hogar (puerta del refrigerador, tazones de comida y agua de las mascotas, piso donde acostumbra habitar más la mascota, interruptores de luz y de las manos de los dueños) en las que todos podrían cohabitar o tener contacto. Las muestras de mascotas fueron obtenidas por hisopado oral y cistocentesis (punción transabdominal de la vejiga). También realizaron la recolección de muestras fecales de las mascotas, y sus dueños adultos (un hombre y una mujer), así como de un menor de 2 años. Se aislaron un total de 124 cepas de *E. coli* de un total de 17 muestras obtenidas de las mascotas, humanos y superficies, de las cuales describen 24 patrones de resistencia distintos de 19 antibióticos de diversas familias, incluidos betalactámicos y quinolonas. Encontraron genes de resistencia a antibióticos como betalactámicos, aminoglucósidos, quinolonas,

tetraciclinas, fenoles y sulfaminas; y determinaron mutaciones en *ampC*, *gyrA* y *parC* presentes en todas las muestras tanto de humanos, mascotas y superficies (Figura 6).

Este antecedente es de relevancia porque se determinó como los hábitos y la cohabitación entre dueños, mascotas y su ambiente en común son un factor importante para la diseminación de *E. coli* en diferentes microambientes y cómo el uso constante de antibióticos tiene un impacto en la resistencia bacteriana hacia ellos (Martins *et al.*, 2013).

Un estudio en Estados Unidos reportó la resistencia a antibióticos de uso cotidiano en medicina humana, entre ellos ciprofloxacino y ácido nalidíxico, en cepas de *E. coli* procedentes de perros y gatos sanos (Jackson, 2015).

Otro estudio realizado en Brasil encontró en algunas cepas de perros y humanos, que tienen como hábitat el mismo hogar, patrones de resistencia a antibióticos similares: genes responsables de la producción de BLEE (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTXM-15} y *bla*_{SHV}) y grupos filogenéticos idénticos (A y B1). Estos datos muestran una homología y, por lo tanto, la posibilidad de que cepas de *E. coli* resistentes circulen entre individuos y animales en el mismo entorno (Carvalho, 2016).

Existen reportes de enterobacterias de importancia clínica, como en Perú donde un grupo de investigadores en 2017 muestrearon en 56 animales silvestres en cautiverio: ardillas, búhos, gaviotas y en colonias de primates no humanos a partir de hisopados rectales y muestreos coprológicos; obtuvieron 106 cepas de la familia Enterobacteriaceae, de las cuales identificaron 45 cepas de *E. coli*, siendo esta especie la aislada con mayor frecuencia (42.5%) y reportaron el 71% de estas cepas sensibles a quinolonas como enrofloxacin la cual es de tercera generación y tiene un amplio espectro de acción; mostrando así que no se ha generado una resistencia a este fármaco en animales primates no humanos, por el contrario, registraron resistencia a cefalotina, tetraciclina, amoxicilina con ácido clavulánico y tobramicina (Famiglietti *et al.*, 2005; Medina *et al.*, 2017).

En México se publicó un estudio realizado en el año 2015, en donde se caracterizó la BLEE CTX-15 en *E. coli* aislada de muestras fecales de perros sanos y se identificaron genes plasmídicos que confieren resistencia a quinolonas (Rocha-Gracia *et al.*, 2015). Además, en 2016 el mismo grupo de trabajo identificó cepas de *E. coli*, obtenidas mediante hisopados

cloacales en tortugas. Entre otros resultados demostraron la presencia de genes plasmídicos como: *qnrA*, *qnrB*, *acc(6')-Ib-cr* y *oqxB*. (Córtes-Córtes *et al.*, 2016).

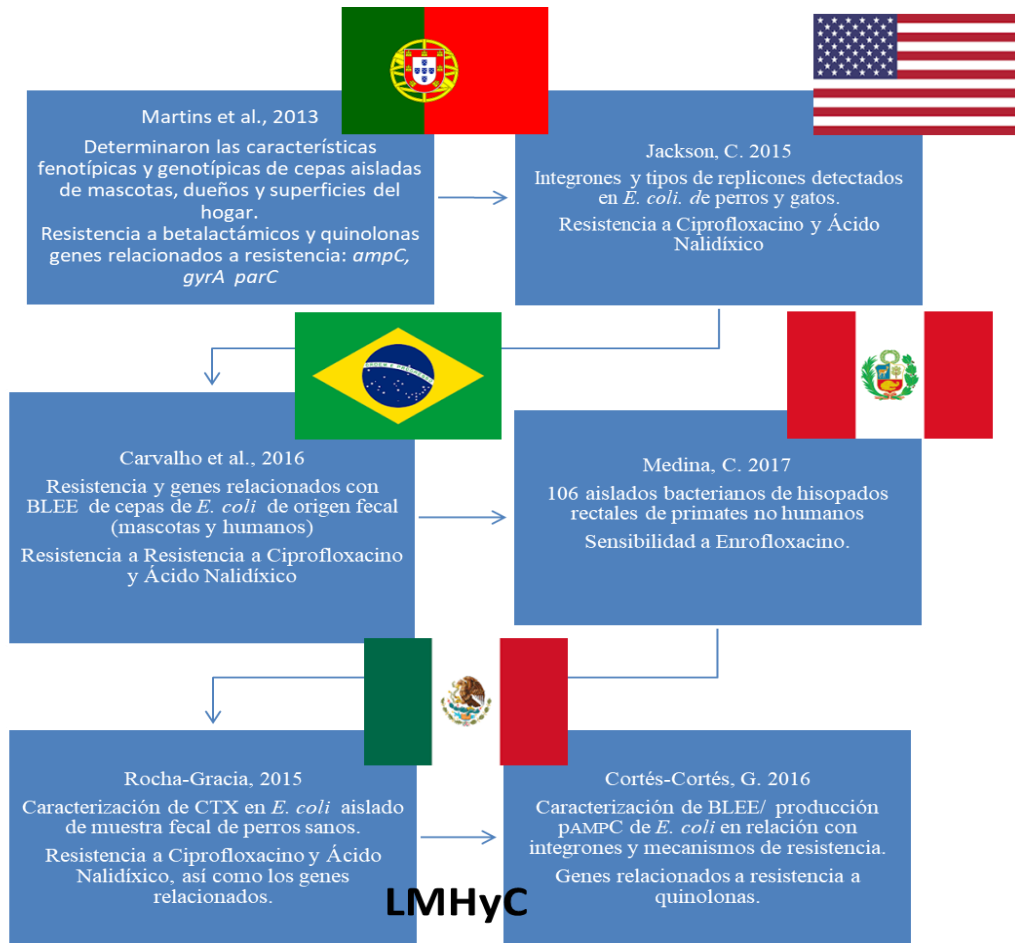


Figura 6. Antecedentes específicos.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La resistencia a antibióticos es una problemática a nivel mundial tanto en bacterias que infectan a los humanos como a los animales, la cual perjudica entornos sociales, de salud, de industria, ganadería e incluso el día a día en nuestros hogares. Es necesario conocer los mecanismos de resistencia que las bacterias han desarrollado de forma evolutiva contra fármacos que son recetados de forma cotidiana tanto por médicos como por veterinarios, como lo son los betalactámicos y las quinolonas. Además, diversas familias de antibióticos son utilizadas en la crianza de ganado o suministrado en el alimento para mascotas y se ha observado que la convivencia entre mascotas y dueños es un factor de riesgo tanto para humanos como para las mascotas de contraer infecciones e intercambiar microbiota.

6. JUSTIFICACIÓN

Las enterobacterias son un grupo amplio de bacterias, de las cuales algunos géneros los encontramos en la microbiota natural de los seres humanos y animales, pero también en el medio ambiente. Dentro de estas encontramos a *E. coli* como responsable de muchas infecciones intestinales y que a lo largo de la historia se ha establecido como una de las enterobacterias de mayor relevancia en las enfermedades de la comunidad y en los hospitales.

Durante las últimas décadas el aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos ha sido un problema en la práctica clínica, debido a varios factores. Uno de los principales es el uso indiscriminado y mal uso de antibióticos betalactámicos y quinolonas que son dos familias de fármacos que más se utilizan tanto en humanos como animales para tratar infecciones producidas por *E. coli*.

La convivencia entre humanos y mascotas es un factor que interviene en la transmisión de microorganismos, debido a que existe la posibilidad de que cepas de *E. coli* resistentes circulen entre individuos y animales en el mismo entorno. Es por ello que resulta necesario conocer los mecanismos de resistencia que las bacterias han desarrollado de forma evolutiva contra fármacos que son recetados de forma cotidiana tanto por médicos como por veterinarios. Debido a lo anterior, el presente trabajo se enfocó a analizar la resistencia

fenotípica a betalactámicos y quinolonas en cepas de *E. coli* aisladas de heces de mascotas y sus dueños.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Estudiar la resistencia fenotípica a quinolonas en cepas de *Escherichia coli* multirresistentes, productoras de BLEE, aisladas de heces de mascotas y sus dueños.

7.2. Objetivos específicos

- 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 identificadas.
- Determinar el fenotipo de producción de β -Lactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en las cepas de *E. coli*.
- Analizar la susceptibilidad fenotípica a quinolonas en las cepas de *E. coli* productoras de BLEE.

8. HIPÓTESIS CIENTÍFICA

La convivencia entre mascotas y sus dueños promueve la presencia de cepas de *E. coli* resistentes a quinolonas y productoras de BLEE en ambos hospederos.

9. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

9.1 Diseño del estudio

Se analizó el fenotipo de susceptibilidad antibiótica de cepas identificadas como *E. coli* aisladas de muestras de mascotas sanas y sus dueños también sanos que acudieron al “Hospital para Pequeñas Especies de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla”. Se realizaron 2 periodos de muestreo: periodo 1, agosto/diciembre del 2017; periodo 2,

enero/mayo del 2018, identificando estas últimas con un asterisco. Este estudio fue prospectivo, ya que permitió analizar los resultados obtenidos y estableció si existe la presencia de cepas *E. coli* multidrogorresistente entre estas dos especies de mamíferos.

9.2. Ubicación espacio-temporal

El proyecto de tesis se realizó en el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad que pertenece al área de Microbiología Médica del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias (ICUAP) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

9.3. Muestreo

Muestreo en perros y humanos sanos. Las muestras de perros sanos se recolectaron a través de un hisopado rectal y fueron colocadas en medio de transporte Stuart y llevadas al laboratorio para su posterior inoculación en medio de cultivo MacConkey suplementado con 2 µg/ml de cefotaxima. Las muestras de humanos fueron recolectadas por ellos mismos con indicaciones previas de obtener una pequeña muestra fecal y que la misma debiera mantenerse en refrigeración y ser entregada en un lapso no mayor a 24 horas. Posteriormente fueron inoculadas en el laboratorio, de la misma manera que las recolectadas de perros.

9.3.1. Definición de la población

En el estudio participaron 50 humanos sin restricción en la edad, ni el sexo. Así como sus mascotas (perros) de cualquier sexo, edad y raza, la información fue recaudada por un cuestionario (ver anexo 1), con la finalidad de obtener un total de 100 muestras.

9.3.2. Selección de la muestra

En mascotas las muestras fueron obtenidas por el médico veterinario a través de un hisopado rectal y en humanos se recolectó una muestra de heces frescas y de ahí se sembró un hisopado en medio de cultivo selectivo con antibiótico cefotaxima. Se seleccionaron aquellas muestras que cumplieron con los criterios descritos más adelante.

9.3.3. Criterios de selección de las unidades de muestreo

9.3.3.1. Criterios de inclusión

Se tomó en cuenta en este estudio a toda persona y su mascota perro sano que acudían al Hospital para Pequeñas Especies de la BUAP en el periodo de agosto del 2017 a mayo del 2018.

- Los perros sanos participantes en este estudio fueron aquellos que:
 - Acudieron a una revisión rutinaria, a una cita estética, que presentaron infecciones cutáneas o respiratorias sin previa administración de antibióticos, que fueron citados para la aplicación de vacunas, que sufrían de algún traumatismo o acudían a alguna terapia de rehabilitación.
- Los humanos que se tomaron en cuenta fueron aquellos que convivían con dichas mascotas, así quedó establecido su rol de dueños.
 - Debían ser sanos, es decir no cursar ningún cuadro infeccioso durante la toma de muestra, así como también ser informados previamente del objetivo del estudio, llenaron una encuesta sobre sus datos personales y de las mascotas, firmaron el consentimiento informado y el permiso de toma de muestra de sus mascotas y de ellos mismos.

9.3.3.2. Criterios de exclusión

Mascotas y dueños que presentaron infecciones gastrointestinales y/o estaban llevando un tratamiento con antibióticos. Además, si el dueño no firmaba el consentimiento informado para la toma y procesamiento de las muestras, no se podrían incluir las muestras de la mascota ni las del dueño en el estudio.

9.3.3.3. Criterios de eliminación

- Muestras que la persona no entregó de acuerdo con las indicaciones previas (refrigeración no más de 24 horas y en el medio de transporte Stuart que se le proporcionó).

- Muestras que después de ser sembradas en medio de cultivo MacConkey con cefotaxima, no presentaron crecimiento.
- Cepas no identificadas como *E. coli*.

9.4. Diseño y tipo de muestreo

Muestreo probabilístico aleatorio. Sin importar en humanos el sexo y la edad y sin tomar en cuenta la raza, sexo y edad de las mascotas.

9.5. Tamaño de la muestra

Se buscó analizar un total de 100 muestras, entre las cuales se pudiera tener un número proporcional entre dueños y mascotas.

9.6. Definición de las variables y escala de medición.

Para personas y mascotas: Ser sanos, al no presentar un cuadro de infección gastrointestinal y no llevar un tratamiento con antibióticos, al menos 2 meses antes. Se llevó un correcto registro de la fecha de toma de muestra y del proceso de las muestras fecales obtenidas.

Las escalas de medición para la susceptibilidad a antibióticos fueron las establecidas en los criterios del Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) 2019, el cual nos ayudó a determinar si existe resistencia, resistencia intermedia o sensibilidad a los 18 antibióticos que se analizaron en este estudio. Y siguiendo el método de Kirby-Bauer se pudo determinar el fenotipo BLEE.

Se determinó si las cepas de *E. coli* que mostraron una producción fenotípica de betalactamasas también muestran resistencia a quinolonas, todo esto mediante el método Kirby-Bauer, que permite determinar una resistencia fenotípica.

9.7. Método y recolección de datos

Para identificar las cepas que crecieron en Mac Conkey como pertenecientes a la especie *E. coli*, se utilizaron las pruebas bioquímicas rutinarias (Mac Faddin, 2003). La susceptibilidad a antibióticos y el fenotipo BLEE se determinaron por medio de la técnica de Kirby Bauer y siguiendo lo establecido en el CLSI 2019.

9.8. Recursos humanos

Alumnos: René Antonio Cuevas Bravo, Flor Yazmin Abad Bolaños.

Profesores: D.C Rosa del Carmen Rocha Gracia (LMHyC), D.C. Edwin Barrios Lima, D.C. Gerardo Cortés Cortés y Dr. Rafael Erazo Montes Ramírez (Hospital para pequeñas especies).

9.9. Recursos materiales

- Medio de transporte Stuart ® MCD Lab.
- Medio de cultivo MacConkey ® 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.
- Medio de cultivo LEVINE ® Bioxon.
- Cefotaxima (Sigma-Aldrich).
- Sensidiscos con antibióticos.
- Taq polimerasa.
- Buffer.
- Cloruro de Magnesio.
- DNTPs
- Reactivos para la lectura de pruebas bioquímicas: Alfa-naftol, rojo de metilo, indol, etc.

9.10. Recursos financieros

Este trabajo fue dirigido y financiado por el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad, el cual pertenece al Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas del

Instituto de Ciencias de la BUAP. Con apoyo de proyectos grupales VIEP-100182644, y por el proyecto CB 2017-2018-A1-S-22136 de Conacyt, responsable académica Dra. Rosa del Carmen Rocha Gracia.

9.11. Bioética

Las muestras fueron tomadas con el consentimiento y autorización de las personas, quienes también fungieron como dueños de las mascotas a quienes se les tomó la muestra. Este consentimiento fue evidenciado a través de un *Formato de consentimiento informado* que el dueño firmó (ver anexo 2).

10. MATERIAL Y MÉTODOS

10.1. Estrategia de trabajo

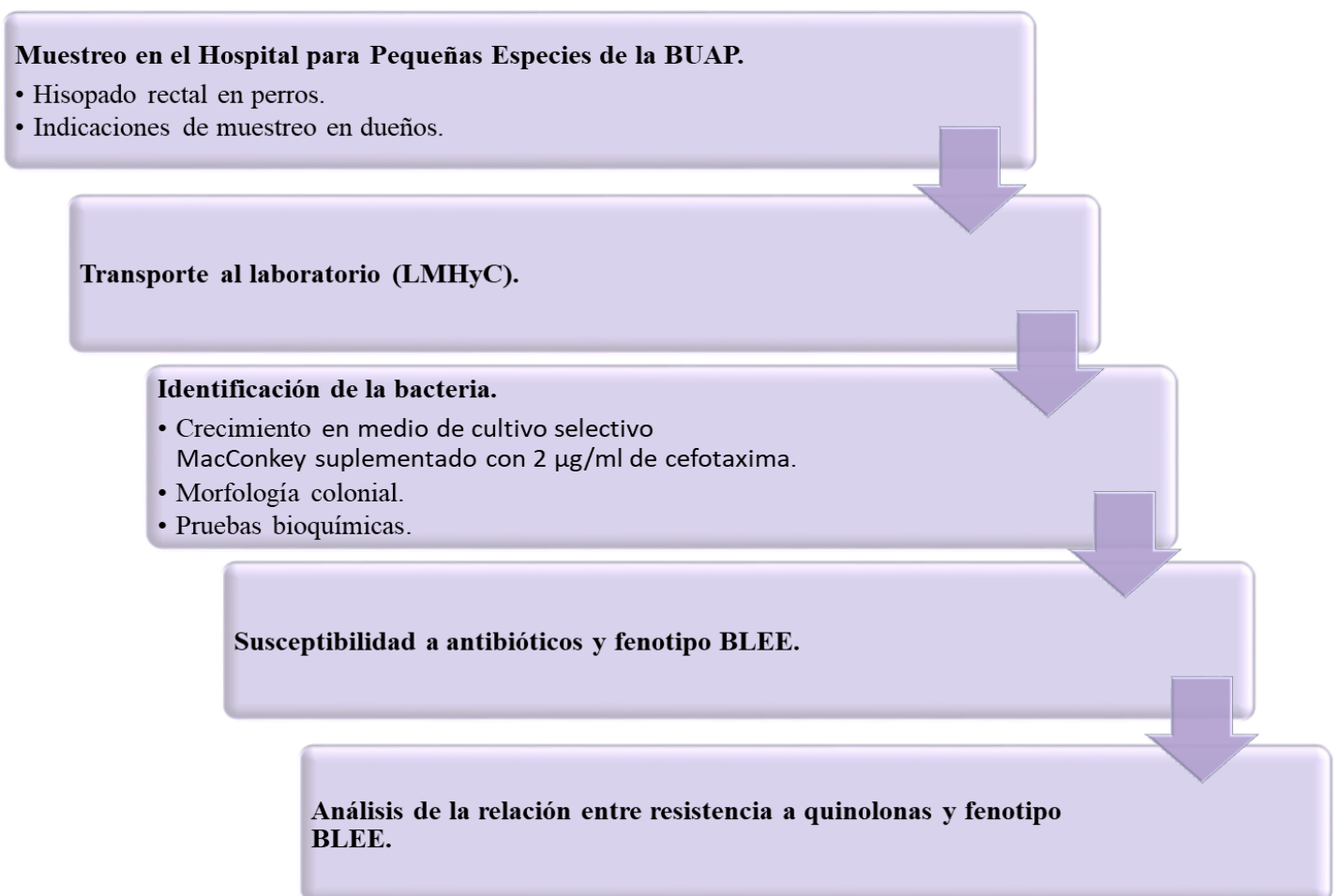


Figura 7. Esquema de trabajo.

Aislamiento e identificación de *E. coli*.

-Aislamiento de cepas.

Acudimos al Hospital para Pequeñas Especies de la BUAP, en Puebla, Puebla; en donde se obtuvieron las muestras que se utilizaron en este trabajo. Para ello se explicó el objetivo y justificación del trabajo a los dueños de las mascotas que cumplían con los criterios de selección, para obtener la aprobación de los mismos y así poder explicar cómo se hace la toma de muestra tanto en humanos como en las mascotas.

Las muestras tomadas a las mascotas fueron obtenidas por los veterinarios del personal médico del hospital, y las muestras de los dueños fueron recogidas por las mismas personas y llevadas al hospital antes de 24 horas. Las muestras se etiquetaron y llevaron en el medio de transporte Stuart al LMHyC perteneciente al CICM del ICUAP. Posteriormente las muestras se sembraron por estría cruzada en placas de MacConkey suplementado con 2 µg/mL de Cefotaxima incubadas por 24 horas a 37°C. Se realizó lo anterior como el primer filtro de nuestro estudio, ya que este medio de cultivo es un medio selectivo para Enterobacterias y al adicionar antibiótico en él, hace que las bacterias que son potencialmente resistentes a dicho antibiótico (y potencialmente productoras de BLEE) crezcan en el medio. Por lo tanto, las muestras que no mostraron un crecimiento en este medio selectivo con antibiótico fueron descartadas.

Las cepas que crecieron en el medio antes mencionado, fueron purificadas y resembradas por estría masiva en placas de agar TSA e incubadas por 24 horas a 37°C. El crecimiento obtenido se suspendió en viales de 1 mL caldo BHI más glicerol (10% vol/vol), para congelarlas a -70°C para su posterior estudio.

-Identificación de *E. coli*.

Se utilizaron las pruebas bioquímicas sugeridas en el método de Cowan y Steel, específicas para Enterobacterias: Agar Hierro Triple Azúcar (TSI), Agar Hierro Lisina (LIA), Citrato (CIT), Movilidad Indol Ornitina (MIO), Fenilalanina (FEN), Rojo de Metilo-Voges Proskauer (MR-VP) y Urea (ver anexo 3). Posteriormente los resultados se analizaron en comparación con los esquemas de identificación señalados en este método, en el manual de Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica de

MacFaddin, utilizando la clasificación taxonómica propuesta en la 2ª edición del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (MacFaddin, 2003).

-Susceptibilidad a antibióticos.

Para conocer la susceptibilidad a antibióticos, se utilizó el método de Kirby-Bauer se trabajó con 18 antibióticos, siguiendo la guía del CLSI 2019: cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), amoxicilina con ácido clavulánico (AMC), cefepime (FEP), Aztreonam (ATM), ampicilina (AMP), meropenem (MEM), imipenem (IMP), ceftioxitina (FOX), ceftriaxona (CRO), tetraciclina (TE), gentamicina (GM), estreptomina (STR), amikacina (AN), trimetoprim-sulfametoxazol (TMP/STX), cloranfenicol (CHL), ciprofloxacino (CIP) y ácido nalidíxico (NA).

El método de Kirby-Bauer es una técnica de antibiograma basada en la difusión del antibiótico impregnando en sensidiscos en concentraciones estándar (CLSI, 2019), los cuales se utilizaron para conocer la susceptibilidad a antibióticos y el fenotipo BLEE de cada cepa previamente crecida en agar Mueller-Hinton.

De un cultivo previo de TSA por estría cruzada que fue incubado a 37° C por 24 horas, se tomaron con un asa bacteriológica las colonias más aisladas (entre 3-6) y se llevaron a un tubo con 5 mL de Solución Salina Isotónica (SSI) al 0.85% masa/volumen de NaCl, para tener una mezcla homogénea y se ajustó la turbidez a 1.5×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro equivalente a 0.5 en escala de McFarland. Una vez que se obtuvo esta turbidez, se impregnó un hisopo con dicha suspensión y se inoculó una placa de Muller-Hinton utilizando el hisopo cubriendo el diámetro de la placa, para después de extremo a extremo pasar el hisopo cubriendo el área de la placa de arriba abajo y se giró la placa 45°; esto se realizó un total de tres veces y al finalizar se pasó el hisopo por la circunferencia de la placa tres veces.

Siguiendo la guía del CLSI 2019, se interpretaron los resultados de acuerdo con la Tabla 3, donde se muestran las concentraciones por sensidisco de cada antibiótico usado y el diámetro del halo de inhibición que debe tomarse en cuenta para conocer la susceptibilidad a dicho antibiótico:

TABLA 3. SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS (CLSI, 2019)						
FAMILIA	ANTIBIÓTICO	CONCENTRACIÓN (µg)	SUSCEPTIBLE (S)	INTERMEDIO (I)	RESISTENCIA (R)	
BETALACTÁMICOS	FENOTIPO BLEE	CTX	30 µg	≥26	23-25	≤22
		CAZ	30 µg	≥21	18-20	≤17
		AMC	20/10 µg	≥18	14-17	≤13
		FEP	30 µg	≥25	19-24	≤18
		ATM	30 µg	≥21	18-20	≤17
	PENICILINAS	AMP	10 µg	≥17	14-16	≤13
	CARBAPENÉMICOS	MEM	10 µg	≥23	20-22	≤19
		IMP	10 µg	≥23	20-22	≤19
	CEFAMINAS	FOX	30 µg	≥18	15-17	≤14
		CRO	30 µg	≥23	20-22	≤19
QUINOLONAS	CIP	5 µg	≥26	22-25	≤21	
	NA	30 µg	≥19	14-18	≤13	
FENOLES	CHL	30 µg	≥18	13-17	≤12	
AMINOGLUCÓSIDOS	AN	30 µg	≥17	15-16	≤14	
	GM	10 µg	≥15	13-14	≤12	
	STR	10 µg	≥15	12-14	≤11	
SULFAMINAS	STX	1.25/23.75 µg	≥16	11-15	≤10	
TETRACICLINA	TE	30 µg	≥15	12-14	≤11	

La distribución de los sensidiscos por placa se realizó de la siguiente manera (Figura 8):

Placa 1: gentamicina (GM), amikacina (AN), estreptomina (STR), ciprofloxacino (CIP), ácido nalidíxico (NA), trimetoprim-sulfametoxazol (TMP/STX) y tetraciclina (TE).

Placa 2: cloranfenicol (CHL), cefoxitina (FOX), ceftriaxona (CRO), ampicilia (AMP), meropenem (MEM) y imipenem (IMP).

Placa 3 (utilizada también para determinar el fenotipo BLEE): cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), amoxicilina con ácido clavulánico (AMC), cefepime (FEP) y aztreonam (ATM).

- Determinación de fenotipo BLEE:

Se tiene conocimiento de diversas pruebas fenotípicas para la detección de BLEE, la mayoría se basan en la actividad inhibitoria del ácido clavulánico. Entre ellas se encuentra la técnica de difusión con disco en la que la presencia de una BLEE se sospecha no sólo por la resistencia o disminución de los halos de inhibición de algunos o todos los sustratos, sino también por el efecto sinérgico producido entre las cefalosporinas de espectro ampliado o los monobactámicos y la amoxicilina con ácido clavulánico. Esta es la técnica que se utilizó para conocer el fenotipo BLEE (Figura 8, placa 3).

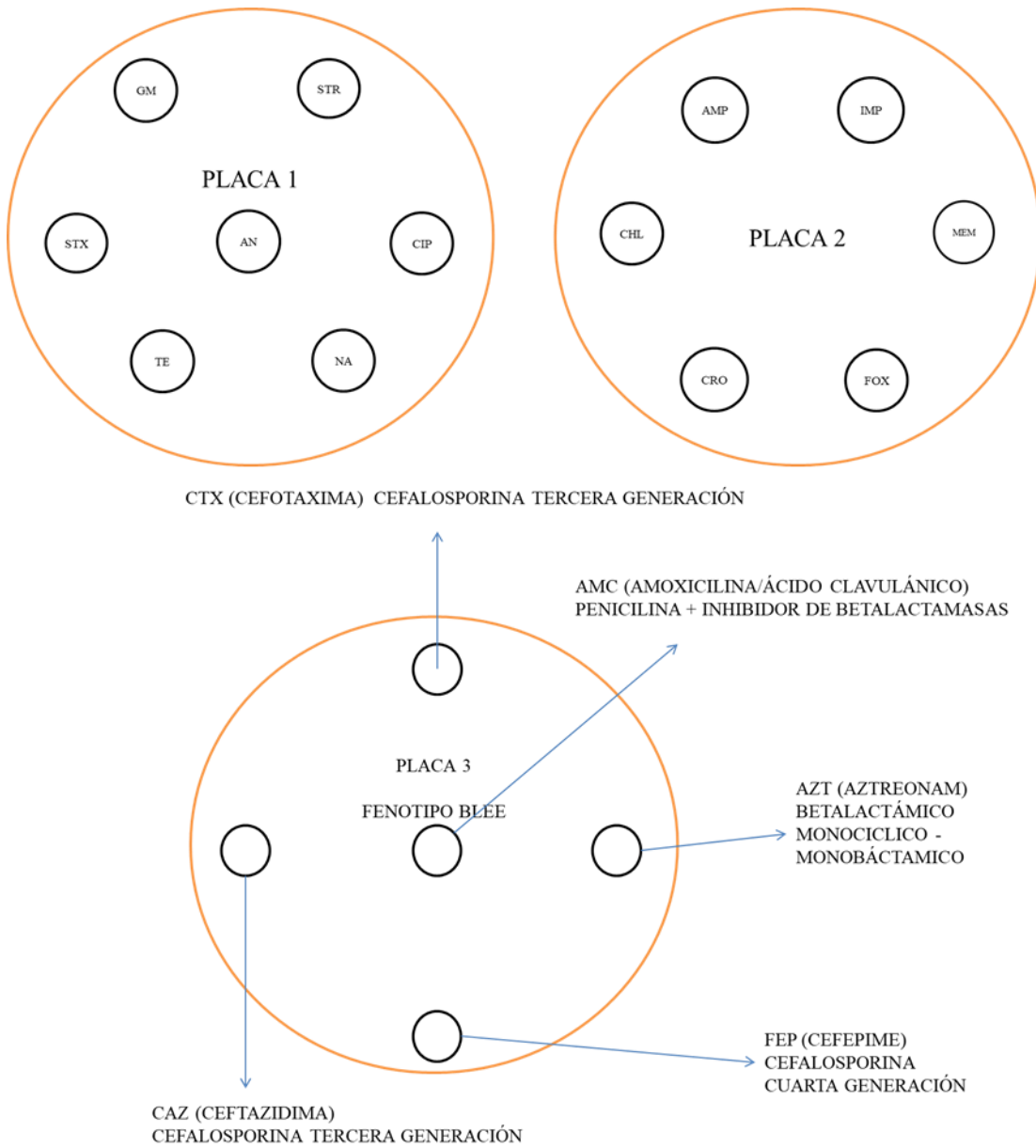


Figura 8. Distribución de sensidiscos para susceptibilidad de antibióticos y fenotipo BLEE.

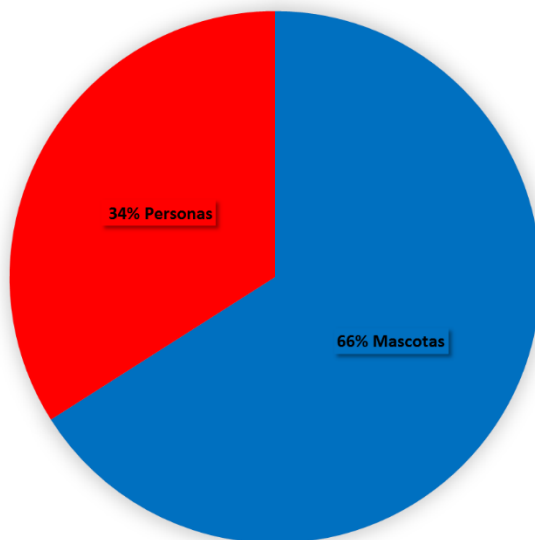
11. RESULTADOS

Objetivo 1. Aislar e identificar cepas de *E. coli* presuntivamente resistentes a CTX, a partir de muestras de heces de mascotas y sus dueños.

-Aislamiento de cepas a partir de muestras de heces de mascotas y dueños.

En el Hospital para Pequeñas Especies de la BUAP se obtuvieron un total de 66 muestras de heces de perros, una por perro, a partir de un hisopado rectal realizado bajo el consentimiento de sus dueños. En el mismo sitio se instruyó a 50 personas para proporcionar una muestra de heces para lo cual, se les proporcionó el material para que en un máximo de 24 horas después de tomada la muestra, la entregaran al Hospital. Se obtuvieron 34 muestras de heces de humanos. Cabe resaltar que se obtuvo un mayor número de muestras en perros, ya que nosotros pudimos obtenerlas al momento de su visita al Hospital, y las humanas dependían de que ellos mismos llevaran o no las muestras. Por lo tanto, se tuvo un total de 100 muestras que fueron sembradas por estría cruzada en placas de MacConkey suplementado con 2 µg/ml de cefotaxima incubadas por 24 horas a 37°C (Gráfica 1).

Gráfica 1. Total de muestras obtenidas



La morfología que se consideró para identificar a *E. coli* es la siguiente: colonias rosadas en medio selectivo MacConkey, colonias verdes oscuras con brillo metálico en medio Levine y en agar TSA se muestra un crecimiento con colonias generalmente con un ligero tono beige.

Las pruebas bioquímicas nos indicarán que en su mayoría *E. coli* produce indol, es móvil, descarboxila ornitina (en menor medida) y lisina, producen gas de glucosa, fermentan la glucosa y otros carbohidratos, son rojo de metilo positivo. Sin embargo, son Citrato de Simmons, Urea, TSI, Voges-Proskauer y Fenilalanina negativo. Lo cual se confirmó utilizando la cepa control de *E. coli* C-1550 (MacFaddin, 2003) (Figura 9).

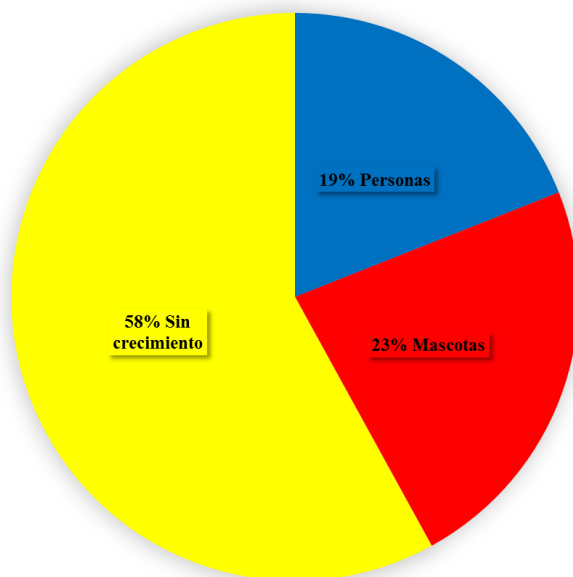


Figura 9. Fenotipo de *E. coli* en agar MacConkey, Levine, TSA y pruebas bioquímicas.

-Identificación de cepas de *E. coli* presuntamente resistentes a CTX.

Después de 24 horas las placas con crecimiento presuntivo de *E. coli*, fueron resembradas por estría masiva en placas de agar TSA e incubadas por 24 horas a 37°C. De un total de 100 muestras obtenidas, se observó que solo el 42% creció en el medio selectivo con antibiótico, lo que las hace cepas presuntamente resistentes a cefotaxima y posiblemente productoras de BLEE. El 23% (n= 23) del total fueron obtenidas de muestras de perros y el 19% (n= 19) de humanos. El crecimiento obtenido se suspendió en viales con medio de cultivo y glicerol y se mantuvieron a -70°C. El 58% de las muestras que no crecieron en Mac Conkey + CTX fueron descartadas (Gráfica 2).

Gráfica 2. Crecimiento de cepas de *E. coli* en medio Mac Conkey + CTX



-Identificación de cepas de *E. coli* utilizando pruebas bioquímicas

Las 42 cepas aisladas se sembraron en 7 pruebas bioquímicas sugeridas en el método de Cowan y Steel. Se identificaron 34 cepas como *Escherichia coli*, 14 de las ellas fueron aisladas de personas y 20 aisladas de perros. Durante el estudio 2 cepas dejaron de ser viables, 3 presentaron contaminación por otra bacteria y 3 no fueron identificadas, pero pertenecen a la familia de Enterobacterias, como se muestra en el anexo 4.

De acuerdo a lo obtenido se pudieron relacionar 9 parejas que consistían en la cepa de humano (H) con su respectiva mascota (P). Se descartaron 2 cepas para este estudio, debido a que la cepa 18H presentó contaminación y al realizar una tinción Gram se pudo observar la contaminación con una bacteria Gram positiva; y la cepa 27H no fue identificada como *E. coli*. Por lo tanto, estas dos cepas no se pudieron relacionar con las cepas parejas 18P y 27P, respectivamente, y fueron descartadas (Ver anexo 4). Por lo tanto, se contó con 7 parejas de cepas obtenidas de mascotas y sus respectivos dueños (Tabla 4).

TABLA 4. CEPAS DE <i>E. coli</i> OBTENIDAS DE PERROS Y SUS DUEÑOS												
Parejas	MUESTRA	TSI	LIA	M	I	O	CIT	UREA	FEN	RM	VP	BACTERIA
1	1H	A/A +GAS	K/K	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
	1P	A/A	K/A	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
2	2H	A/A +GAS	K/K	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
	2P	A/A	K/K	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
3	3P	A/A	K/K	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
	3H	A/A	K/K	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
4	12 H*	A/A	K/K	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
	12P2*	A/A +GAS	K/K	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
5	17H	A/A+GAS	K/K	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	<i>E. coli</i>
	17P3	A/A +GAS	K/K	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
6	20H*	A/A +GAS	K/K	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
	20 P*	A/A +GAS	K/K	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
7	21H	A/A +GAS	K/K	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
	21P	A/A +GAS	K/K	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>

TSI: Agar Hiero Triple Azúcar K/K (No fermentación de carbohidratos) A/A (Fermentación de glucosa, lactosa y/o sacarosa) +GAS (Producción de gas en el medio) -LIA: Agar Hierro Lisina K/K (Descarboxilación de lisina) -CIT: Citrato -MIO: Movilidad Indol Ornitina -FEN: Fenilalanina -MR-VP: Rojo de Metilo/Voges Proskauer -Urea
 (*) Cepas que corresponden al muestreo del segundo periodo. -P: Perro -H: Dueño.

Objetivo 2. Determinar la susceptibilidad antimicrobiana a las cepas identificadas.

Las 34 cepas de *E. coli* se sometieron a pruebas de susceptibilidad a 18 antibióticos por Kirby-Bauer, siguiendo la guía del CLSI 2019 para definir a una cepa como resistente, intermedio o susceptible al antibiótico; por lo tanto, se obtuvieron los perfiles fenotípicos de susceptibilidad a antibióticos de cada cepa (Tabla 5).

TABLA 5. PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE <i>E. coli</i>																		
CEPA	β-LACTÁMICOS										AMINOGLUCÓSIDOS			QUINOLONAS		OTROS		
	AMP	CTX	CAZ	AMC	FEP	ATM	IMP	MEM	FOX	CRO	AN	GM	S	CIP	NA	TE	TMP/SMX	CHL
	HUMANOS (n=14)																	
1H	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	R	S	R	R	S	S	R	
2H	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	S	R	R	S	S
3H	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	R	S
5H*	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
7H	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S
8H*	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S
12H*	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R
17H	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S
20H	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	R
20H*	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R
21H	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R	R	S	S
24H	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
29H*	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R
32H	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S
TOTAL R (%)	13 (93%)	13 (93%)	12 (86%)	5 (36%)	13 (93%)	13 (93%)	1 (7%)	-	2 (14%)	14(100%)	3 (22%)	9 (64%)	11 (78%)	11 (78%)	10 (71%)	10 (71%)	9 (64%)	6 (43%)
TOTAL S (%)	1 (7%)	1 (7%)	2 (14%)	9 (64%)	1 (7%)	1 (7%)	13 (93%)	14(100%)	12 (86%)	-	11 (78%)	5 (36%)	3 (22%)	3 (22%)	4 (29%)	4 (29%)	5 (36%)	8 (57%)
	MASCOTAS (n=20)																	
1P	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
1P*	R	R	S	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S
2P	S	R	R	S	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R
3P	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
7P*	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S
9P	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R
9P*	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R
12P2*	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R
13P*	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R
17 P3	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S
18P	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R

20P*	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S
21P	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S
23P	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R
26P	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	S	R	R	S	R	R	R	S
27 P	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	R
31 P*	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R
34 P*	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	S	S
36P	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R
37P	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R
TOTAL R (%)	19 (95%)	19 (95%)	17 (85%)	6 (30%)	17 (85%)	17 (85%)	8 (40%)	1 (5%)	5 (25%)	19 (95%)	2 (10%)	11 (55%)	16 (80)	17 (85%)	17 (85%)	17 (85%)	15 (75%)	12 (60%)
TOTAL S (%)	1 (5%)	1 (5%)	3 (15%)	14 (70%)	3 (15%)	3 (15%)	12 (60%)	19 (95%)	15 (75%)	1 (5%)	18 (90%)	9 (45%)	4 (20%)	3 (15%)	3 (15%)	3 (15%)	5 (25%)	8 (40%)
RELACIÓN MASCOTA-HUMANO																		
	AMP	CTX	CAZ	AMC	FEP	ATM	IMP	MEM	FOX	CRO	AN	GM	S	CIP	NA	TE	TMP/SMX	CHL
PAREJAS																		
1P	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
1H	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R	S	S	R
2P	S	R	R	S	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R
2H	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	S	R	R	S	S
3P	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
3H	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	R	S
12P2*	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R
12H*	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R
17P3	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S
17H	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S
20P*	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S
20H*	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R
21P	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S
21H	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R	R	S	S
AMP: ampicilina, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, AMC: amoxicilina/ácido clavulánico, FEP: cefepime, ATM: aztreonam, IMP: imipenem, MEM: meropenem, FOX: ceftoxitina, CRO: ceftriaxona, AN: amikacina, GM: gentamicina, S: estreptomina, TE: tetraciclina, CIP: ciprofloxacina, NA: ácido nalidíxico, TMP/STX: trimetoprim/sulfametoxazol, CHL: cloranfenicol, (*) Cepas que corresponden al muestreo del segundo periodo, P: Perro y H: Dueño.																		
RESISTENTE (R)																		
SENSIBLE (S)																		

De las 34 cepas de *E. coli* identificadas, respecto a la familia de betalactámicos el 94% fueron resistentes a ampicilina (AMP) y 6% susceptibles. En las dos cefalosporinas de tercera generación analizadas, se determinó que el 85% de las cepas son resistentes a ceftazidima (CAZ) y 15% susceptibles; 94% resistentes a cefotaxima (CTX) y 6% susceptibles. El 88% de las cepas son resistentes a cefepime (FEP) y aztreonam (ATM), a su vez 12% son

susceptibles a esta cefalosporina de cuarta generación y a este monobactámico; 33% resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) y 67% susceptibles a este antibiótico con inhibidor de betalactamasas.

Cabe mencionar que en los carbapenémicos se observó el mayor porcentaje de susceptibilidad por parte de las cepas. Siendo 3% resistentes a meropenem (MEM) y 97% susceptibles; 26% resistentes imipenem (IMP) y 74% susceptibles (Gráfica 3).

En la familia de las cefamicinas se encuentra una resistencia del 21% y 79% susceptibles en cefoxitina (FOX); caso contrario con el 97% de resistencia y 3% susceptibles hacia ceftriaxona (CRO), al ser este último una cefalosporina de tercera generación (Gráfica 3).

Respecto a los antibióticos aminoglucósidos el 15% resistentes a amikacina (AN) y 85% susceptibles; el 59% resistentes a gentamicina (GM) y 41% susceptibles; 79% mostraron resistencia a estreptomina (S) y 21% susceptibles.

Respecto a las quinolonas utilizadas en este estudio, el 82% de las cepas mostraron resistencia a ciprofloxacino (CIP), y 18% susceptibles; 79% resistentes a ácido nalidíxico (NA) y 21% susceptibles. Siendo este último de primera generación y determinándose mayor resistencia en la quinolona de segunda generación.

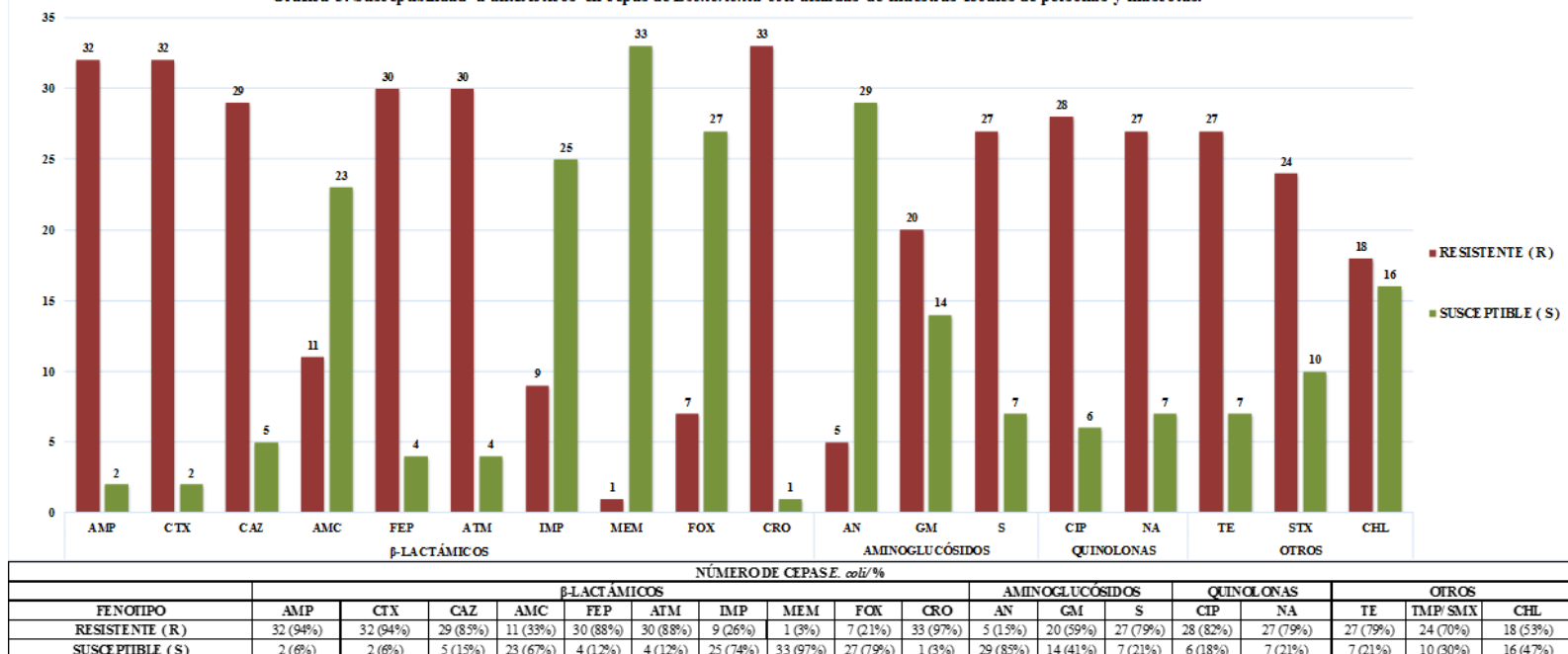
El 79% de las cepas fueron resistente a tetraciclina (TE) y 21% susceptibles; mostrando unos de los porcentajes más altos de resistencia hacia esta familia de antibióticos.

El 70% de las cepas fueron resistentes a trimetoprim con sulfametoxazol (TMP/STX), y 30% susceptibles, a este miembro de la familia sulfaminas. Por otro lado, el 53% de cepas fue resistente a cloranfenicol (CHL) y 47% susceptibles, siendo esta familia de antibióticos la que muestra una proporción similar entre resistencia y susceptibilidad (Gráfica 3).

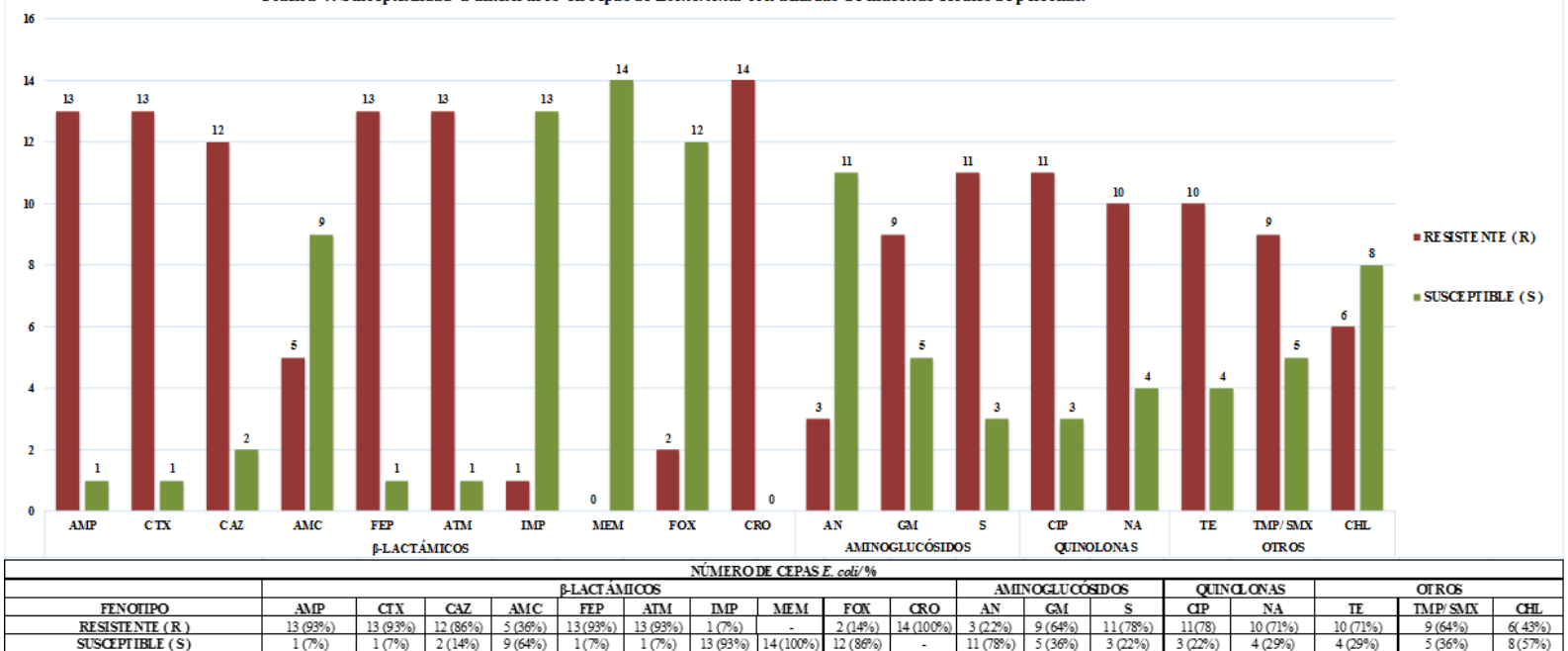
En lo general, de las cepas aisladas de humanos el 100% fueron multidrogosresistentes (MDR); a pesar de mostrar resultados heterogéneos respecto a los perfiles de susceptibilidad antibiótica (Gráfica 4), llama la atención la cepa 3H, que mostró un perfil susceptible a 13 antibióticos, siendo resistente a ATM, CRO, CIP, NA Y TMP/STX. Mientras que la cepa 24H es resistente a 15 antibióticos, pero susceptible a IMP, MEM y CHL (Tabla 5).

Por otro lado, dentro de las cepas aisladas de mascotas encontramos un 95% de cepas MDR, un ejemplo es la cepa 3P que mostró ser resistente a 15 de 18 antibióticos y susceptible a IMP, MEM y FOX. Un caso contrario es la cepa 1P que mostró ser susceptible a 15 de los 18 antibióticos empleados, siendo AMP, ATM, y NA los antibióticos a los que es resistente (Gráfica 5) (Tabla 5).

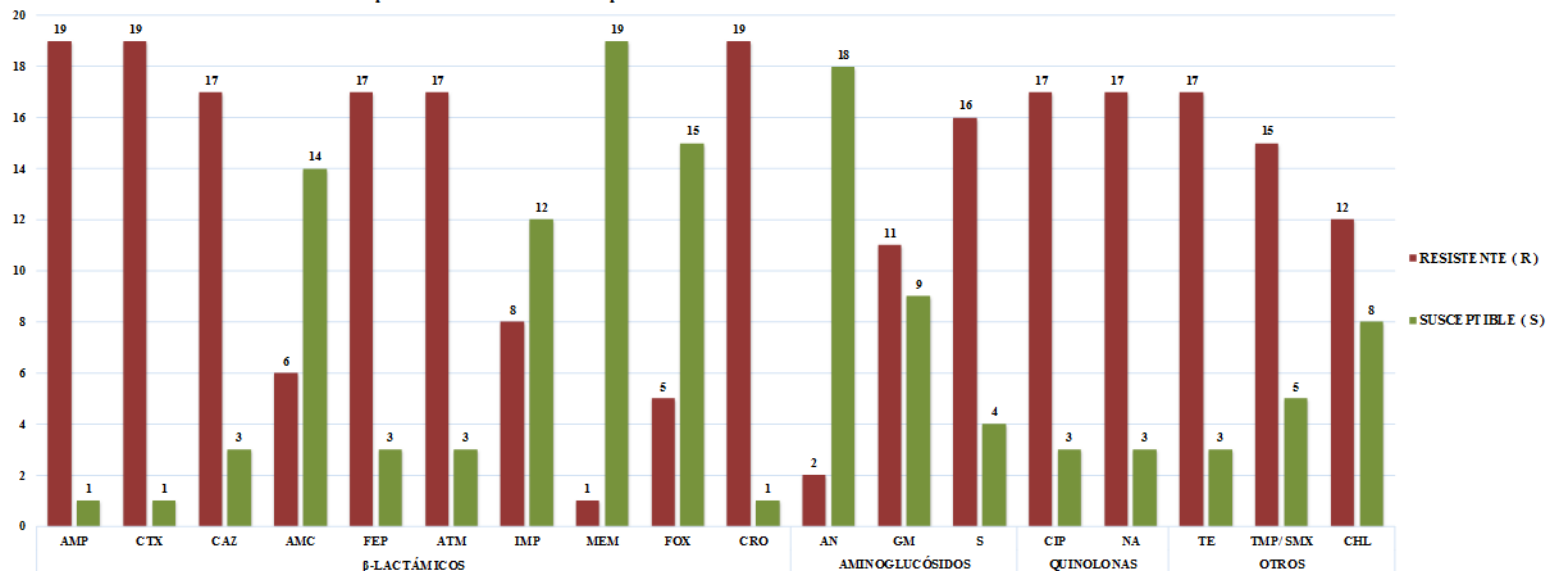
Gráfica 3. Susceptibilidad a antibióticos en cepas de *Escherichia coli* aisladas de muestras fecales de personas y mascotas.



Gráfica 4. Susceptibilidad a antibióticos en cepas de *Escherichia coli* aisladas de muestras fecales de personas.



Gráfica 5. Susceptibilidad a antibióticos en cepas de *Escherichia coli* aisladas de muestras fecales de mascotas.



NÚMERO DE CEPAS <i>E. coli</i> y (%)																			
	β-LACTÁMICOS						AMINOGLUCÓSIDOS					QUINOLONAS			OTROS				
FENOTIPO	AMP	CTX	CAZ	AMC	FEP	ATM	IMP	MEM	FOX	CRO	AN	GM	S	CIP	NA	TE	TMP/SMX	CHL	
RESISTENTE (R)	19 (95%)	19 (95%)	17 (85%)	6 (30%)	17 (85%)	17 (85%)	8 (40%)	1 (5%)	5 (25%)	19 (95%)	2 (10%)	11 (55%)	16 (80)	17 (85%)	17 (85%)	17 (85%)	15 (75%)	12 (60%)	
SUSCEPTIBLE (S)	1 (5%)	1 (5%)	3 (15%)	14 (70%)	3 (15%)	3 (15%)	12 (60%)	19 (95%)	15 (75%)	1 (5%)	18 (90%)	9 (45%)	4 (20%)	3 (15%)	3 (15%)	3 (15%)	5 (25%)	8 (40%)	

-Análisis de la relación entre cepas de *E. coli* provenientes de mascotas y sus dueños.

Dentro de nuestra población de estudio, después del análisis de la susceptibilidad y del fenotipo BLEE, nos quedamos con 7 parejas de cepas conformadas por las cepas 1P y 1H, 2H y 2P, 3H y 3P, 12P2* y 12H*, 17H y 17P3, 20H* y 20P*, 21H y 21P, y, las cuales muestran un porcentaje de similitud de características fenotípicas de susceptibilidad a antibióticos de: 55%, 66%, 44%, 94%, 77%, 89% y 77% respectivamente. Sin embargo, la pareja conformada por las cepas 12H* y 12P2* es la que muestra mayor porcentaje de similitud en sus características fenotípicas de susceptibilidad a antibióticos. De forma contraria, tenemos las parejas 1H y 1P, y 3H y 3P las cuales cuentan con un porcentaje menor al 60%.

Del análisis de estas parejas se obtiene la siguiente información, para obtener el 100% de antibióticos estudiados (18 antibióticos) de cada cepa, se graficó considerando los porcentajes de resistencia, intermedios (en los que existan) y susceptibles, mostrando en colores como se describe a continuación (Figura 10/23).

Analizando la relación de las cepas de mascotas y sus dueños se tiene que entre las cepas 1H y 1P las similitudes en resistencia se muestran sólo en AMP, ATM y NA; y son susceptibles ambas cepas para los antibióticos AMC, IMP, MEM, FOX, GM, TE y TMP/STX. De esta manera la cepa 1P es susceptible a 15 de 18 antibióticos analizados. Pero la cepa 1H es resistente a 11 de ellos (Figura 10 y 11).

Entre las cepas 2H y 2P son resistentes ambas a CTX, CAZ, FEP, ATM, CRO, GM, S, NA y TE; y susceptibles a MEM, FOX y AN. Mientras que la cepa 2P es susceptible también a AMP y AMC, la cepa 2H es resistente. Además, la cepa 2H muestra susceptibilidad a IMP y CIP, pero 2P es resistente para el carbapenémico y a la quinolona de segunda generación (Figura 12 y 13).

La pareja conformada por las cepas 3H y 3P tiene muchas diferencias en sus perfiles de susceptibilidad, ya que la cepa 3H es susceptible al 72% de los antibióticos y la cepa 3P es resistentes al 83% de ellos. Únicamente mostraron ser similares a la susceptibilidad de IMP,

MEM y FOX, así como a la resistencia de ATM, NA, CIP, TMP/STX y CRO (Figura 14 y 15).

Las cepas 12H* y 12P2* son resistentes al 72% y 66% de los antibióticos respectivamente, siendo ambas resistentes a AMP, CTX, FEP, CAZ, ATM, CRO S, CIP, NA, TE, TMP/STX y CHL; y muestran susceptibilidad hacia AMC, IMP, MEM, AN y FOX. La cepa 12P2* es susceptible a GM. Mientras que la cepa 12H* es resistente (Tabla 5) (Figura 16 y 17).

Entre las cepas 17H y 17P3 hay similitudes de resistencia hacia los antibióticos: AMP, CTX, CAZ, FEP, ATM, S, TE, TMP/STX, CIP Y CRO; así como en la susceptibilidad a IMP, MEM, AN Y CHL. Ambas cepas son resistentes al 61% de los antibióticos, pero no a los mismo, ya que difieren en GM y NA (Figura 18 y 19).

Las cepas 20H* y 20P* son resistente al 72% de los antibióticos analizados, siendo ambas resistentes a AMP, AMC, CTX, CAZ, FEP, ATM, GM, S, TE, CIP, NA, TMP/STX y CRO; así como sensibles al 28% a IMP, MEM, AN y FOX. La cepa 20H* muestra susceptibilidad a AMC y resistente a CHL, mientras que la cepa 20P* es resistente al antibiótico con inhibidor de betalactamasas y susceptible al fenol (Figura 20 y 21).

Las cepas 21H y 21P son susceptibles a IMP, MEM, CHL y FOX; y ambas son resistentes a AMP, CTX, CAZ, FEP, ATM, S, TE, CIP y NA y CRO. La cepa 21P es sensible a AMC y AN, mientras que su pareja muestra resistencia; y la cepa 21H tiene un resultado sensible para GM y TMP/STX, contrario a la resistencia que muestra su pareja hacia ambos antibióticos (Figura 22 y 23).

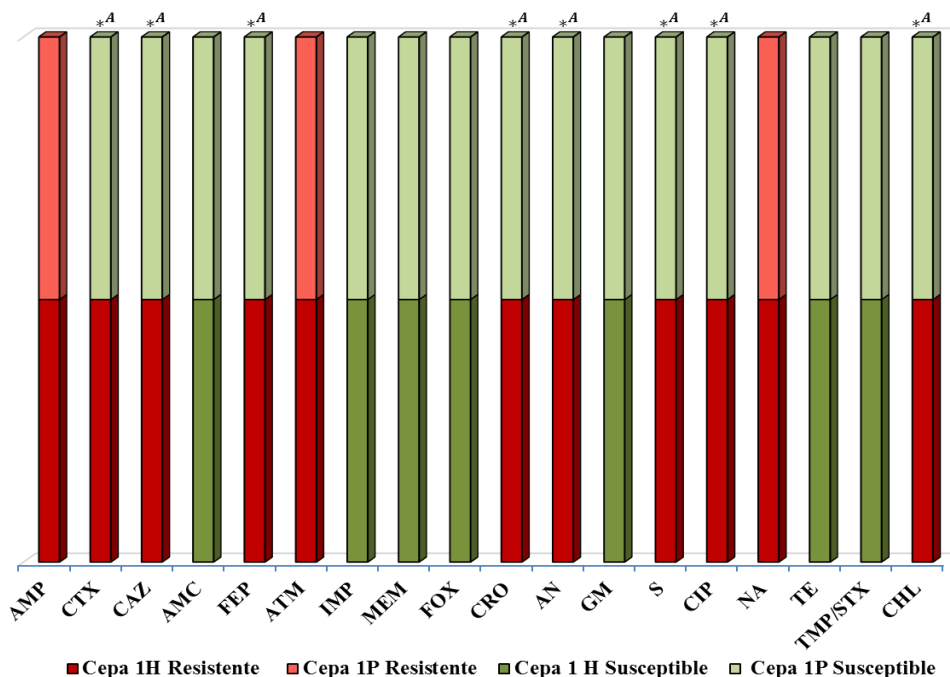


Figura 10. Comparación de fenotipo de susceptibilidad a los antibióticos entre *E. coli* aislada de mascotas y sus dueños en cepas 1H y 1P. AMP: ampicilina, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, AMC: amoxicilina/ácido clavulánico, FEP: cefepime, ATM: aztreonam, IMP: imipenem, MEM: meropenem, FOX: cefoxitina, CRO: ceftriaxona, AN: amikacina, GM: gentamicina, S: estreptomina, TE: tetraciclina, CIP: ciprofloxacina, NA: ácido nalidíxico, TMP/STX: trimetoprim/sulfametoxazol, CHL: cloranfenicol, P: Perro, H: Dueño y *^A: Perfiles diferentes.

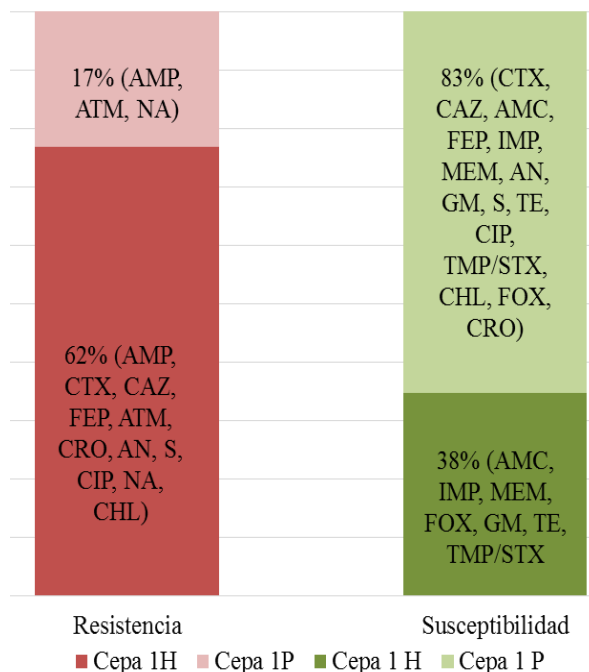


Figura 11. Comparación entre el porcentaje de susceptibilidad a los antibióticos entre *E. coli* aislada de mascotas y sus dueños en cepas 1H y 1P. AMP: ampicilina, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, AMC: amoxicilina/ácido clavulánico, FEP: cefepime, ATM: aztreonam, IMP: imipenem, MEM: meropenem, FOX: cefoxitina, CRO: ceftriaxona, AN: amikacina, GM: gentamicina, S: estreptomina, TE: tetraciclina, CIP: ciprofloxacina, NA: ácido nalidíxico, TMP/STX: trimetoprim/sulfametoxazol, CHL: cloranfenicol, P: Perro y H: Dueño.

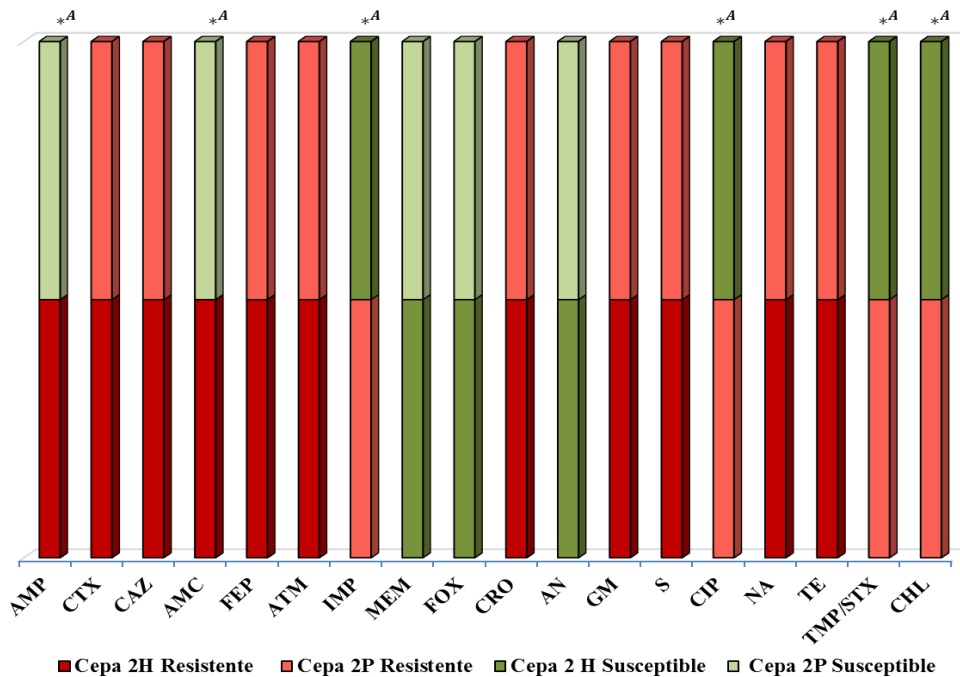


Figura 12. Comparación de fenotipo de susceptibilidad a los antibióticos entre *E. coli* aislada de mascotas y sus dueños en cepas 2H y 2P. AMP: ampicilina, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, AMC: amoxicilina/ácido clavulánico, FEP: cefepime, ATM: aztreonam, IMP: imipenem, MEM: meropenem, FOX: cefoxitina, CRO: ceftriaxona, AN: amikacina, GM: gentamicina, S: estreptomina, TE: tetraciclina, CIP: ciprofloxacina, NA: ácido nalidíxico, TMP/STX: trimetoprim/sulfametoxazol, CHL: cloranfenicol, P: Perro, H: Dueño y *^A: Perfiles diferentes.

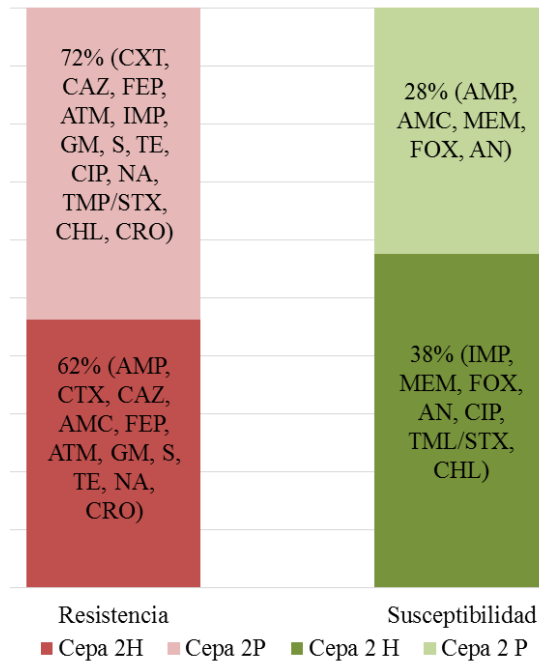


Figura 13. Comparación entre el porcentaje de susceptibilidad a los antibióticos entre *E. coli* aislada de mascotas y sus dueños en cepas 2H y 2P. AMP: ampicilina, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, AMC: amoxicilina/ácido clavulánico, FEP: cefepime, ATM: aztreonam, IMP: imipenem, MEM: meropenem, FOX: cefoxitina, CRO: ceftriaxona, AN: amikacina, GM: gentamicina, S: estreptomina, TE: tetraciclina, CIP: ciprofloxacina, NA: ácido nalidíxico, TMP/STX: trimetoprim/sulfametoxazol, CHL: cloranfenicol, P: Perro y H: Dueño.

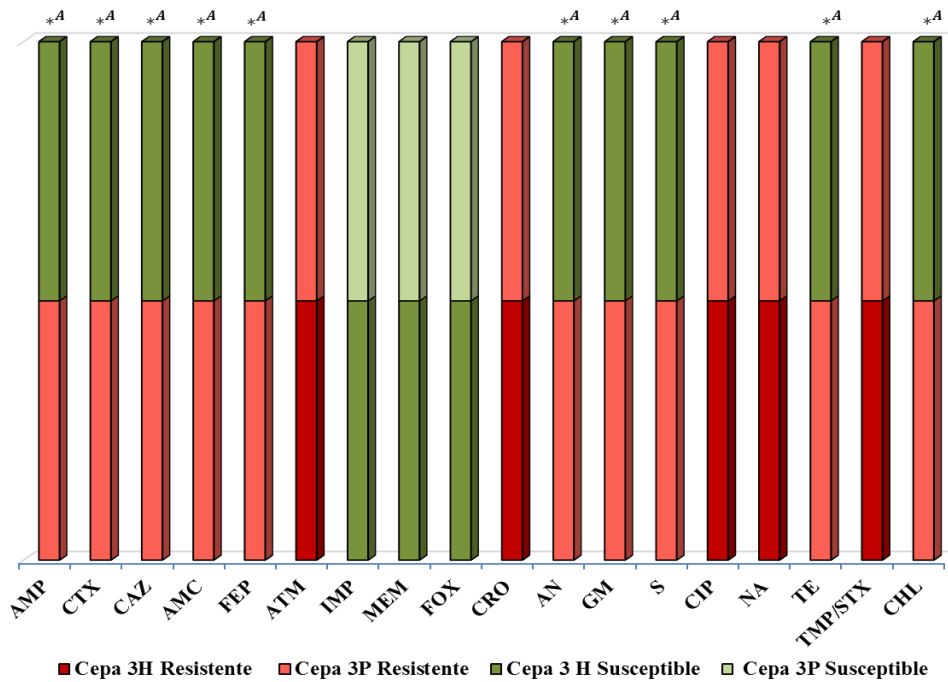


Figura 14. Comparación de fenotipo de susceptibilidad a los antibióticos entre *E. coli* aislada de mascotas y sus dueños en cepas 3H y 3P. AMP: ampicilina, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, AMC: amoxicilina/ácido clavulánico, FEP: cefepime, ATM: aztreonam, IMP: imipenem, MEM: meropenem, FOX: ceftaxitina, CRO: ceftriaxona, AN: amikacina, GM: gentamicina, S: estreptomicina, TE: tetraciclina, CIP: ciprofloxacina, NA: ácido nalidíxico, TMP/STX: trimetoprim/sulfametoxazol, CHL: cloranfenicol, P: Perro, H: Dueño y *⁴: Perfiles diferentes.

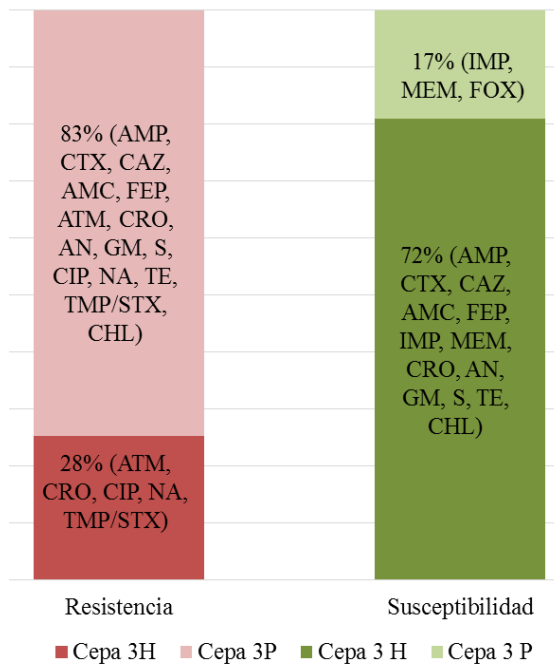


Figura 15. Comparación entre el porcentaje de susceptibilidad a los antibióticos entre *E. coli* aislada de mascotas y sus dueños en cepas 3H y 3P. AMP: ampicilina, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, AMC: amoxicilina/ácido clavulánico, FEP: cefepime, ATM: aztreonam, IMP: imipenem, MEM: meropenem, FOX: ceftaxitina, CRO: ceftriaxona, AN: amikacina, GM: gentamicina, S: estreptomicina, TE: tetraciclina, CIP: ciprofloxacina, NA: ácido nalidíxico, TMP/STX: trimetoprim/sulfametoxazol, CHL: cloranfenicol, P: Perro y H: Dueño.

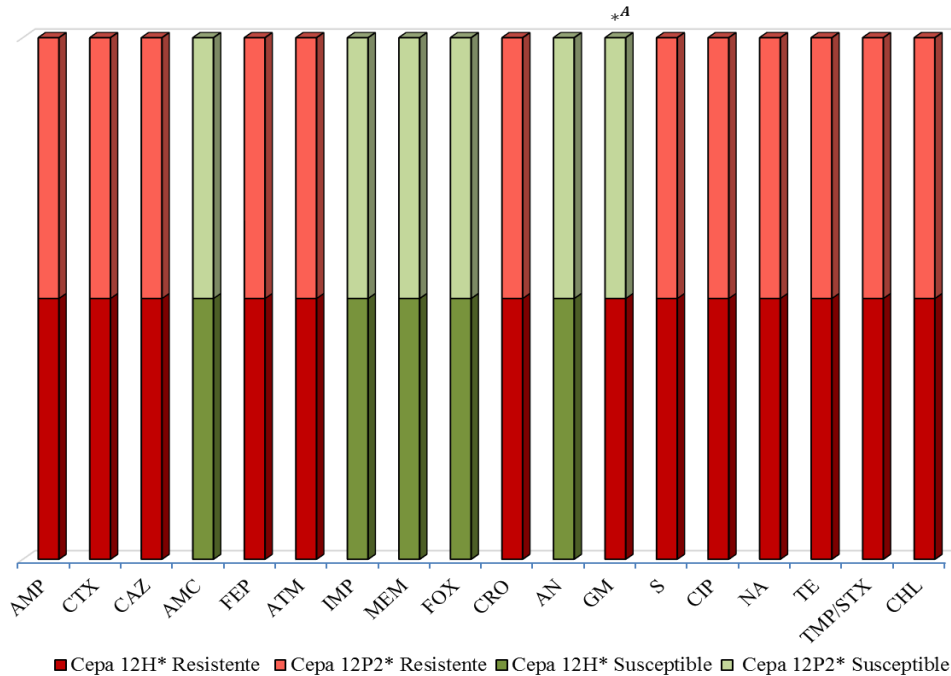


Figura 16. Comparación de fenotipo de susceptibilidad a los antibióticos entre *E. coli* aislada de mascotas y sus dueños en cepas 12H* y 12P2*. AMP: ampicilina, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, AMC: amoxicilina/ácido clavulánico, FEP: cefepime, ATM: aztreonam, IMP: imipenem, MEM: meropenem, FOX: cefoxitina, CRO: ceftriaxona, AN: amikacina, GM: gentamicina, S: estreptomina, TE: tetraciclina, CIP: ciprofloxacina, NA: ácido nalidíxico, TMP/STX: trimetoprim/sulfametoxazol, CHL: cloranfenicol, (*) Cepas que corresponden al muestreo del segundo periodo, P: Perro, H: Dueño y *^A: Perfiles diferentes.

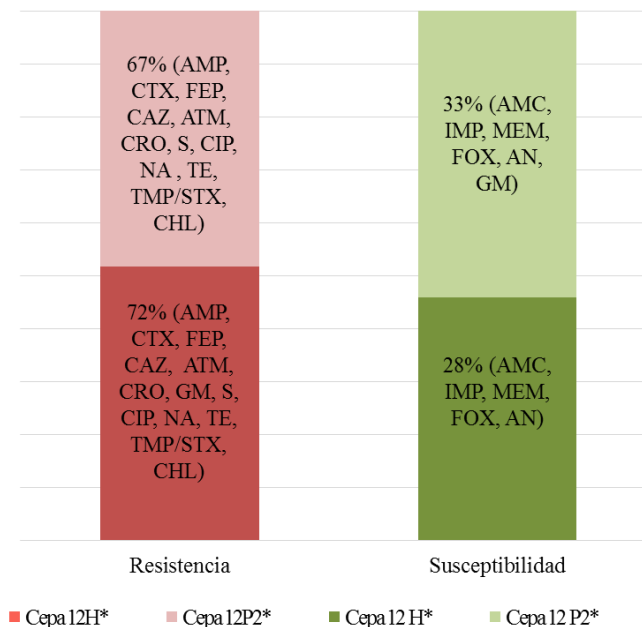


Figura 17. Comparación entre el porcentaje de susceptibilidad a los antibióticos entre *E. coli* aislada de mascotas y sus dueños en cepas 12H* y 12P2*. AMP: ampicilina, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, AMC: amoxicilina/ácido clavulánico, FEP: cefepime, ATM: aztreonam, IMP: imipenem, MEM: meropenem, FOX: cefoxitina, CRO: ceftriaxona, AN: amikacina, GM: gentamicina, S: estreptomina, TE: tetraciclina, CIP: ciprofloxacina, NA: ácido nalidíxico, TMP/STX: trimetoprim/sulfametoxazol, CHL: cloranfenicol, (*) Cepas que corresponden al muestreo del segundo periodo, P: Perro y H: Dueño.

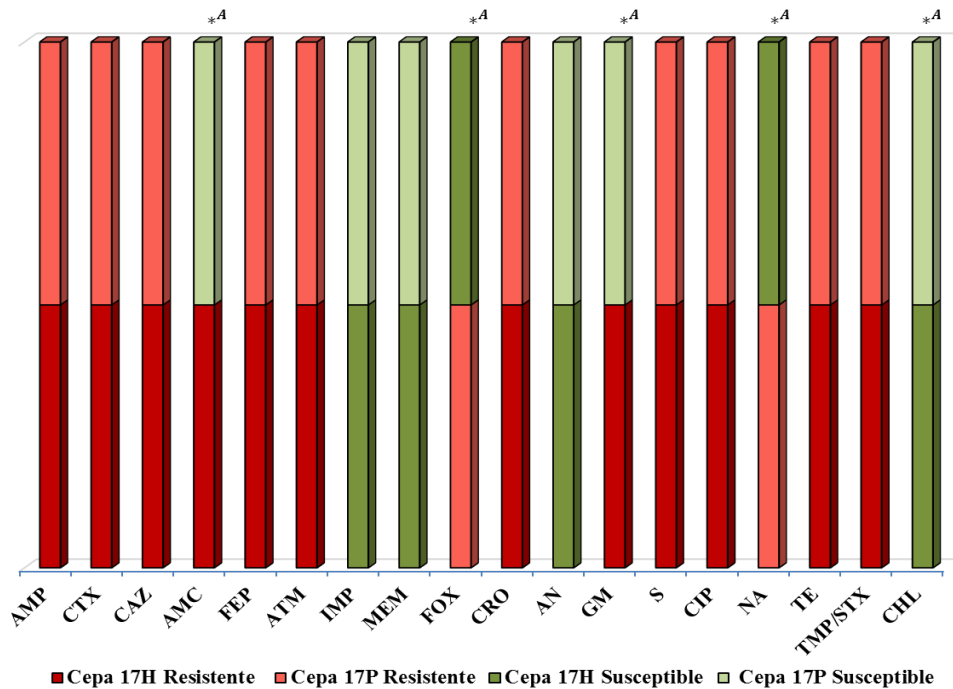


Figura 18. Comparación de fenotipo de susceptibilidad a los antibióticos entre *E. coli* aislada de mascotas y sus dueños en cepas 17H y 17P3. AMP: ampicilina, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, AMC: amoxicilina/ácido clavulánico, FEP: cefepime, ATM: aztreonam, IMP: imipenem, MEM: meropenem, FOX: cefoxitina, CRO: ceftriaxona, AN: amikacina, GM: gentamicina, S: estreptomicina, TE: tetraciclina, CIP: ciprofloxacina, NA: ácido nalidíxico, TMP/STX: trimetoprim/sulfametoxazol, CHL: cloranfenicol, P: Perro, H: Dueño y *A: Perfiles diferentes.

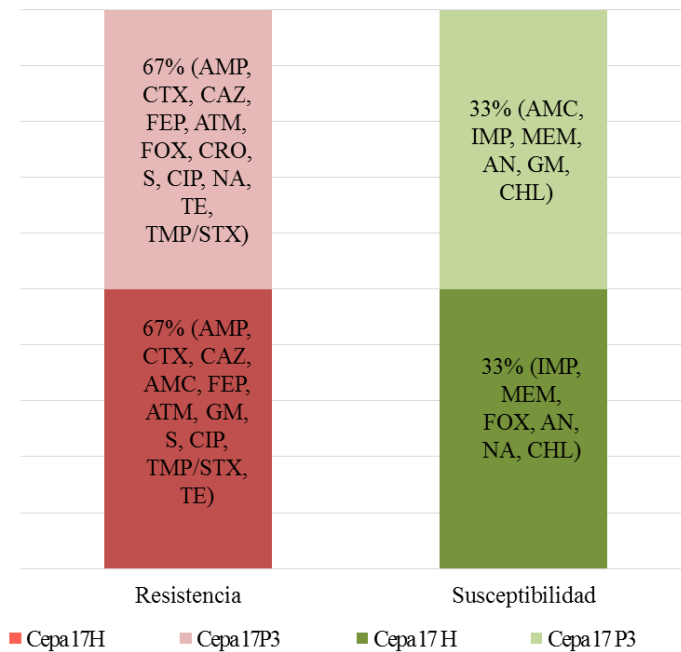


Figura 19. Comparación entre el porcentaje de susceptibilidad a los antibióticos entre *E. coli* aislada de mascotas y sus dueños en cepas 17H y 17P3. AMP: ampicilina, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, AMC: amoxicilina/ácido clavulánico, FEP: cefepime, ATM: aztreonam, IMP: imipenem, MEM: meropenem, FOX: cefoxitina, CRO: ceftriaxona, AN: amikacina, GM: gentamicina, S: estreptomicina, TE: tetraciclina, CIP: ciprofloxacina, NA: ácido nalidíxico, TMP/STX: trimetoprim/sulfametoxazol, CHL: cloranfenicol, P: Perro y H: Dueño.

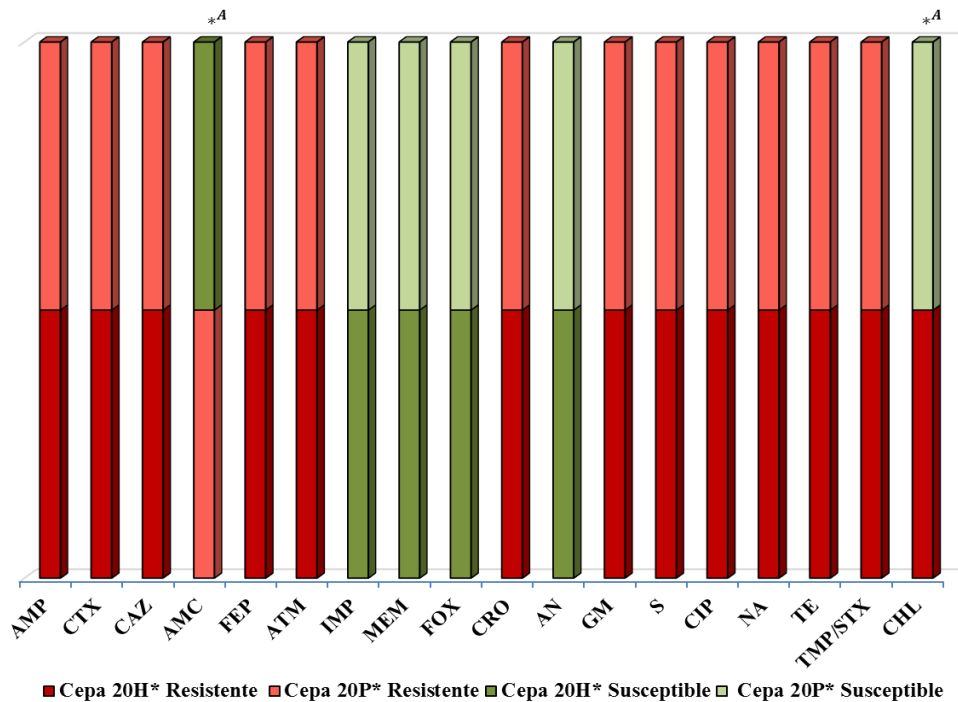


Figura 20. Comparación de fenotipo de susceptibilidad a los antibióticos entre *E. coli* aislada de mascotas y sus dueños en cepas 20H* y 20P*. AMP: ampicilina, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, AMC: amoxicilina/ácido clavulánico, FEP: cefepime, ATM: aztreonam, IMP: imipenem, MEM: meropenem, FOX: cefoxitina, CRO: ceftriaxona, AN: amikacina, GM: gentamicina, S: estreptomicina, TE: tetraciclina, CIP: ciprofloxacina, NA: ácido nalidíxico, TMP/STX: trimetoprim/sulfametoxazol, CHL: cloranfenicol, (*) Cepas que corresponden al muestreo del segundo periodo, P: Perro, H: Dueño y *A: Perfiles diferentes.

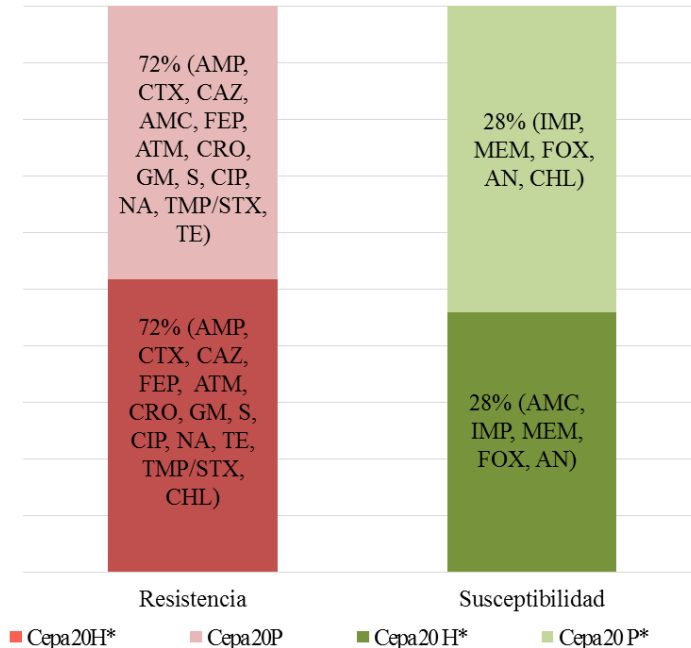


Figura 21. Comparación entre el porcentaje de susceptibilidad a los antibióticos entre *E. coli* aislada de mascotas y sus dueños en cepas 20H* y 20P*. AMP: ampicilina, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, AMC: amoxicilina/ácido clavulánico, FEP: cefepime, ATM: aztreonam, IMP: imipenem, MEM: meropenem, FOX: cefoxitina, CRO: ceftriaxona, AN: amikacina, GM: gentamicina, S: estreptomicina, TE: tetraciclina, CIP: ciprofloxacina, NA: ácido nalidíxico, TMP/STX: trimetoprim/sulfametoxazol, CHL: cloranfenicol, (*) Cepas que corresponden al muestreo del segundo periodo, P: Perro y H: Dueño.

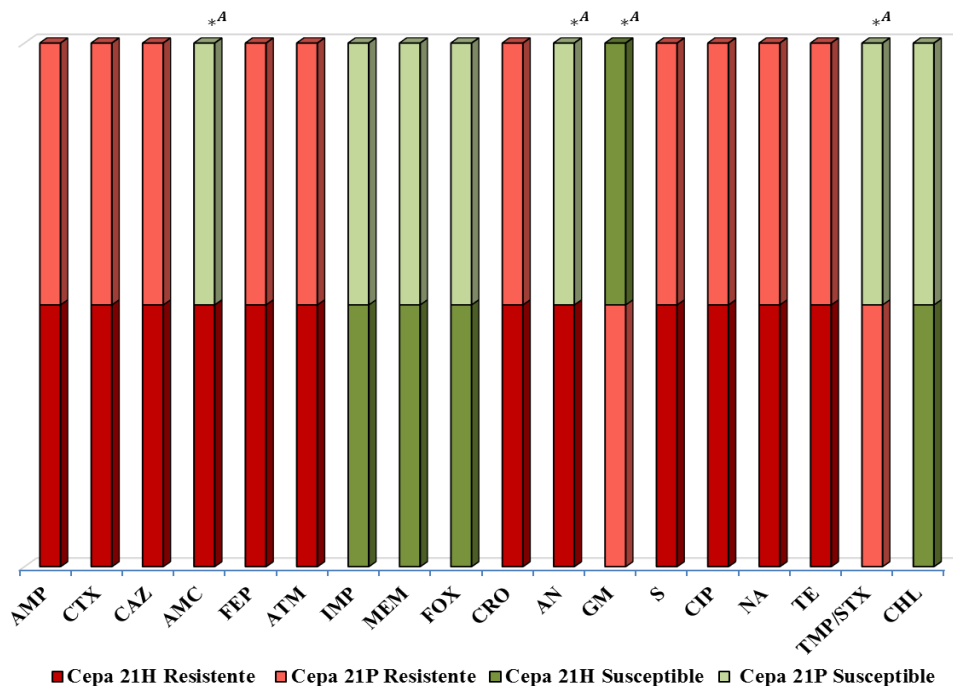


Figura 22. Comparación de fenotipo de susceptibilidad a los antibióticos entre *E. coli* aislada de mascotas y sus dueños en cepas 21H y 21P. AMP: ampicilina, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, AMC: amoxicilina/ácido clavulánico, FEP: cefepime, ATM: aztreonam, IMP: imipenem, MEM: meropenem, FOX: cefoxitina, CRO: ceftriaxona, AN: amikacina, GM: gentamicina, S: estreptomina, TE: tetraciclina, CIP: ciprofloxacina, NA: ácido nalidíxico, TMP/STX: trimetoprim/sulfametoxazol, CHL: cloranfenicol, P: Perro, H: Dueño y *A: Perfiles diferentes.

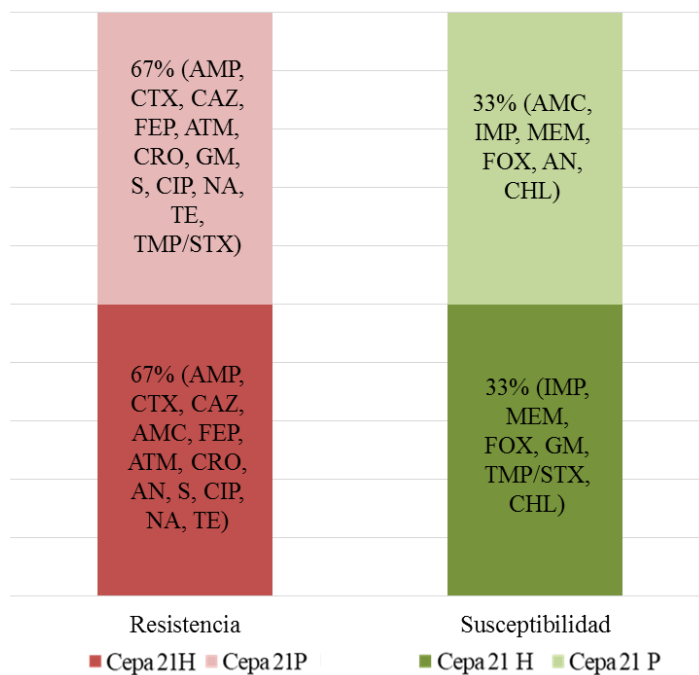


Figura 23. Comparación entre el porcentaje de susceptibilidad a los antibióticos entre *E. coli* aislada de mascotas y sus dueños en cepas 21H y 21P. AMP: ampicilina, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, AMC: amoxicilina/ácido clavulánico, FEP: cefepime, ATM: aztreonam, IMP: imipenem, MEM: meropenem, FOX: cefoxitina, CRO: ceftriaxona, AN: amikacina, GM: gentamicina, S: estreptomina, TE: tetraciclina, CIP: ciprofloxacina, NA: ácido nalidíxico, TMP/STX: trimetoprim/sulfametoxazol, CHL: cloranfenicol, P: Perro y H: Dueño.

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

De acuerdo con el efecto sinérgico producido entre las cefalosporinas de amplio espectro o los monobactámicos y la actividad inhibitoria del ácido clavulánico se determinó que de las 34 cepas de *E. coli* (14 cepas de humano y 20 cepas de perro) analizadas, 29 mostraron fenotipo BLEE siendo un 85% del total (13 cepas de humanos y 16 de perros). De lo cual se pudo observar que el inhibidor actúa en sinergia sobre los cuatro betalactámicos (CTX/CAZ/FEP/ATM) en un 50% de las cepas. En otros casos actúa sobre tres antibióticos: 12% sobre CTX/ FEP/ATM, 8% sobre CAZ/FEP/ATM, 6% sobre las dos cefalosporinas de tercera generación y el monobactámico (CTX/CAZ /ATM), 3% sobre las tres cefalosporinas (CTX/CAZ/FEP). Un 3% inhibe a CAZ/FEP y otro 3% a la cefalosporina de cuarta generación (FEP). Finalmente, en el 15% del total no se observó la sinergia entre la posible presencia de betalactamasa y el inhibidor (Gráfica 13) (Figura 10).

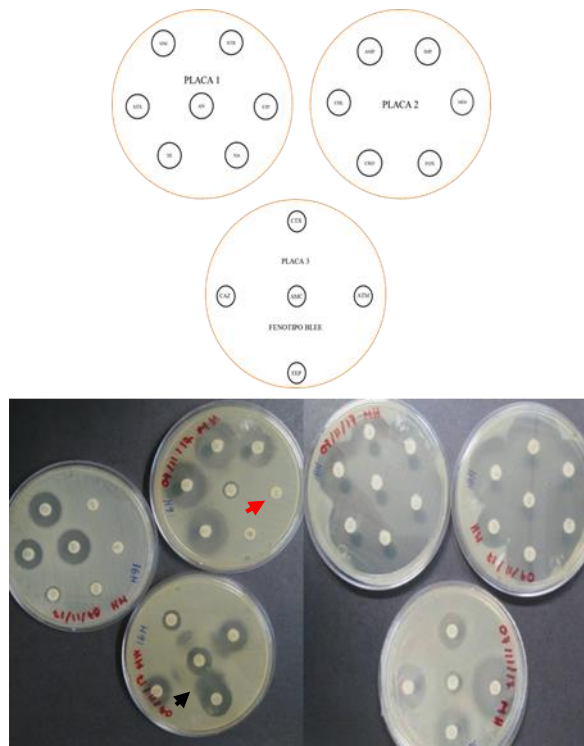
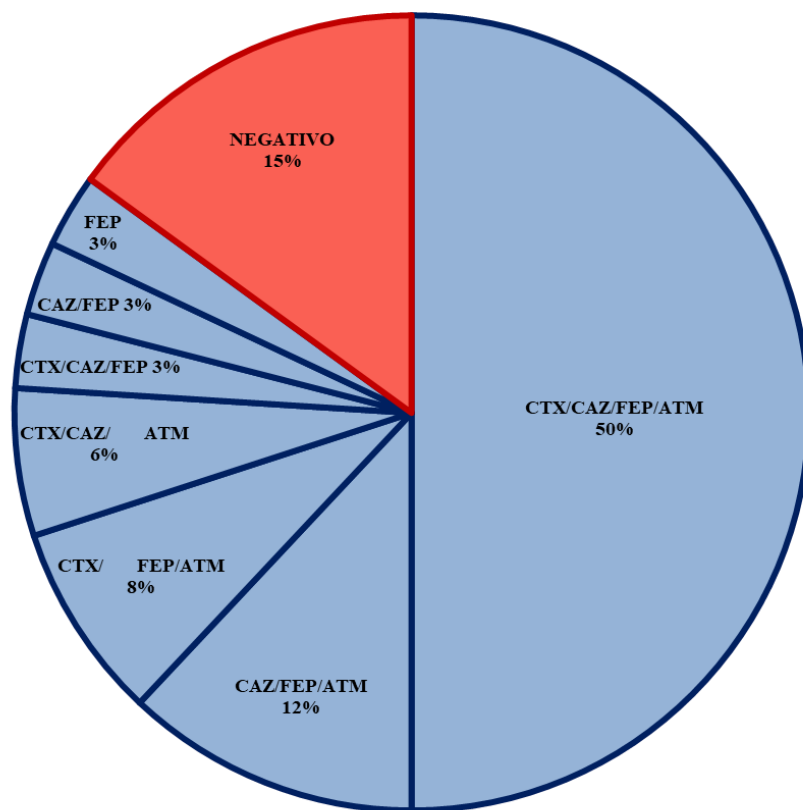


Figura 24. Fenotipo de susceptibilidad a antibióticos y fenotipo BLEE.

La imagen (A) muestra los sensibilizados con halo de inhibición reducido o nulo (ejemplo: flecha negra) y la sinergia del fenotipo BLEE (ejemplo: flecha roja).

La imagen (B) muestra cuando los halos de inhibición marcan susceptibilidad a los antibióticos probados (ejemplo: 2 placas superiores) y un fenotipo BLEE negativo (ejemplo: placa inferior).

Gráfica 6. Fenotipo BLEE en cepas de *E. coli*



Objetivo 4. Analizar la susceptibilidad fenotípica a quinolonas en las cepas de *E. coli* productoras de BLEE.

Teniendo los resultados de la susceptibilidad a antibióticos y el fenotipo BLEE de las cepas de *E. coli*, se seleccionaron aquellas cepas que mostraron resistencia a quinolonas y también con fenotipo BLEE. Por lo tanto, las cepas de humanos que cumplen con estas características fueron: 1H, 5H*, 8H*, 12H*, 20H*, 21H, 24H y 29H*. En el caso de las cepas de mascotas, las que cumplen estas condiciones son: 1P*, 2P, 3P, 7P*, 9P, 9P*, 12P2*, 13P*, 17P3, 20P*, 21P, 23P, 31P*, 34P* y 37P (Tabla 6). Esto quiere decir que 23 (8 de humanos y 15 de mascotas) de las 34 cepas de *E. coli* aisladas fueron resistentes a betalactámicos, presuntamente productoras de betalactamasas y resistentes a quinolonas de primera y segunda generación, representando el 67% de las cepas analizadas.

TABLA 6. SUSCEPTIBILIDAD A BETALACTÁMICOS, QUINOLONAS Y FENOTIPO BLEE <i>E. coli</i>								
	β-LACTÁMICOS					QUINOLONAS		FENOTIPO BLEE
	CTX	CAZ	AMC	FEP	ATM	CIP	NA	
MUESTRAS	HUMANOS (n=14)							
1H	R	R	S	R	R	R	R	CTX/CAZ/FEP/ATM
2H	R	R	R	R	R	S	R	CTX/CAZ/FEP/ATM
3H	S	S	S	S	R	R	R	BLEE NEGATIVO
5H*	R	S	S	R	S	R	R	CAZ/FEP/ATM
7H	R	R	S	R	R	R	S	CTX/CAZ/FEP/ATM
8H*	R	R	R	R	R	R	R	CTX/CAZ/FEP/ATM
12H*	R	R	S	R	R	R	R	CTX/CAZ/FEP/ATM
17H	R	R	R	R	R	R	S	CTX/CAZ/FEP/ATM
20H	R	R	S	R	R	S	S	CTX/CAZ/FEP/ATM
20H*	R	R	S	R	R	R	R	CTX/CAZ/FEP/ATM
21H	R	R	R	R	R	R	R	CTX/CAZ/FEP/ATM
24H	R	R	R	R	R	R	R	CTX/CAZ/FEP/ATM
29H*	R	R	S	R	R	R	R	CTX/CAZ/FEP/ATM
32H	R	R	S	R	R	S	S	CTX FEP/ATM
MUESTRAS	MASCOTAS (n=20)							
1P	S	S	S	S	R	S	R	BLEE NEGATIVO
1P*	R	S	S	R	S	R	R	CTX/CAZ/FEP
2P	R	R	S	R	R	R	R	CTX/ FEP/ATM
3P	R	R	R	R	R	R	R	CTX/CAZ /ATM
7P*	R	R	S	R	R	R	R	CTX/CAZ/FEP/ATM
9P	R	R	R	R	R	R	R	FEP
9P*	R	R	S	R	R	R	R	CAZ/FEP/ATM
12P2*	R	R	S	R	R	R	R	CTX/CAZ/FEP/ATM

13P*	R	S	R	R	R	R	R	CTX/CAZ/FEP/ATM
17 P3	R	R	S	R	R	R	R	CTX/CAZ/FEP/ATM
18P	R	R	R	S	R	S	S	BLEE NEGATIVO
20P*	R	R	R	R	R	R	R	CAZ/FEP
21P	R	R	S	R	R	R	R	CTX/CAZ/FEP/ATM
23P	R	R	S	R	R	R	R	CTX/CAZ /ATM
26P	R	R	S	R	R	S	R	BLEE NEGATIVO
27 P	R	R	S	R	S	R	S	CTX/CAZ/FEP/ATM
31 P*	R	R	S	R	R	R	R	CAZ/FEP/ATM
34 P*	R	R	S	R	R	R	R	CAZ/FEP/ATM
36P	R	R	R	S	S	R	S	BLEE NEGATIVO
37P	R	R	S	R	R	R	R	CTX/ FEP/ATM
RELACIÓN MASCOTA-HUMANO								
PAREJAS	CTX	CAZ	AMC	FEP	ATM	CIP	NA	FENOTIPO BLEE
1P	S	S	S	S	R	S	R	BLEE NEGATIVO
1H	R	R	S	R	R	R	R	CTX/CAZ/FEP/ATM
2P	R	R	S	R	R	R	R	CTX/ FEP/ATM
2H	R	R	R	R	R	S	R	CTX/CAZ/FEP/ATM
3P	R	R	R	R	R	R	R	CTX/CAZ /ATM
3H	S	S	S	S	R	R	R	BLEE NEGATIVO
12P2*	R	R	S	R	R	R	R	CTX/FEP/CAZ/ATM
12H*	R	R	S	R	R	R	R	CTX/FEP/CAZ/ATM
17P3	R	R	S	R	R	R	R	CTX/FEP/CAZ/ATM
17H	R	R	R	R	R	R	S	CTX/FEP/CAZ/ATM
20P*	R	R	R	R	R	R	R	FEP/CAZ
20H*	R	R	S	R	R	R	R	CTX/FEP/CAZ/ATM
21P	R	R	S	R	R	R	R	CTX/FEP/CAZ/ATM
21H	R	R	R	R	R	R	R	CTX/FEP/CAZ/ATM
AMP: Ampicilina, CTX: Cefotaxima, CAZ: Ceftazidima, AMC: Amoxicilina/Ácido clavulánico, FEP: Cefepime, ATM: Aztreonam, CIP: ciprofloxacino, NA: Ácido nalidíxico. (*) Cepas que corresponden al muestreo del segundo periodo, P: Perro y H: Dueño.								
RESISTENTE (R)								
SENSIBLE (S)								
FENOTIPO BLEE NEGATIVO								

12. DISCUSIÓN

La resistencia a antibióticos es un problema que asecha tanto a la comunidad como a los hospitales, ya que la comunidad no solo se compone por los seres humanos que habitamos en ella, sino también por todos los organismos que cohabitan, incluyendo nuestras mascotas y demás animales que comparten el ecosistema.

Es de gran relevancia saber que no solo existe resistencia a antibióticos en bacterias que albergan los seres humanos. También es un problema que enfrentan las bacterias provenientes de mascotas, como perros y gatos, debido a la exposición a fármacos que tienen a través de su alimentación, hábitos, convivencia, así como también el uso indiscriminado y mal uso de los fármacos por parte de sus dueños. Por tal motivo, el presente estudio tomó como población de estudio cepas de *E. coli* aisladas a partir de heces de humanos y sus mascotas, clínicamente sanos, que acudieron al Hospital para Pequeñas Especies de la BUAP, para estudiar el perfil de susceptibilidad a antibióticos. Al realizar este análisis se pudo determinar que existe resistencia a familias de antibióticos importantes, como lo son betalactámicos, quinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas y sulfamidas que son recetados para tratar infecciones producidas por enterobacterias en humanos y mascotas (USDA, 2012; Rodríguez-González, 2020).

En los últimos años se ha tomado conciencia sobre el aumento en la resistencia a antibióticos en animales y humanos, situación que determina la forma en que deben ser tratadas las infecciones. El uso elevado de agentes antimicrobianos en animales y humanos es probablemente la causa de mayor peso en este problema. Dichos agentes llevan a una presión de selección no solo sobre las bacterias patógenas, sino también sobre los microorganismos que pertenecen a la microbiota natural del tracto intestinal de humanos y animales, y esas bacterias comensales resistentes forman un reservorio de genes asociados a resistencia para dichos microorganismos que tienden a ser oportunistas (Costa, 2008).

Por lo tanto, la emergencia de enterobacterias resistentes a la gran variedad de antimicrobianos de importancia clínica, es una relevante realidad a nivel mundial, debido a ello, hay una mayor necesidad de identificar la resistencia a antibióticos con anticipación al tratamiento. Esto se logra a través de realizar cultivos y antibiogramas en laboratorios

clínicos, ya que dicha resistencia es un fenómeno que se da tanto en humanos como en animales.

E. coli se ha utilizado como la especie de referencia para determinar la propagación de resistencia a antibióticos, ya que es una bacteria comensal genéticamente variable de animales y humanos, y tiene la facilidad de diseminarse ampliamente en el medio ambiente (suelo, agua y por ende en los alimentos). La producción de BLEE y el desarrollo de resistencia a quinolonas son constantes en cepas de *E. coli* y eso representa una gran amenaza para la salud humana y animal (USDA, 2012; Rodríguez-González, 2020).

Por otro lado, en otros casos, se reporta que algunos de los determinantes genéticos de la resistencia a quinolonas se encuentran en plásmidos de diversos tamaños y se encuentran asociados a otros marcadores de resistencia como los genes que codifican las BLEE, lo que indica la propagación de resistencia en cepas de enterobacterias que contribuyen a la multidrogo resistencia (Yanat *et al.*, 2017).

Algo relevante del estudio fue observar que el 67% de cepas de *E. coli* aisladas de mascotas y dueños mostraron ser resistentes a betalactámicos y ser posibles productoras de betalactamasas, aunado a que también son resistentes a quinolonas de primera y segunda generación. La principal causa de resistencia a quinolonas en *E. coli* se da por un mecanismo cromosómico mediante mutaciones en la QRDR de los genes *gyrA* y *parC* (Meireles, 2015).

Lo anterior pone en evidencia que las bacterias productoras de BLEE pueden ser también resistentes a otros grupos antibióticos, específicamente a quinolonas, trimetoprima con sulfametoxazol y aminoglucósidos, siendo transferida esta co-resistencia a través de elementos genéticos movilizables como integrones insertados en plásmidos (Peralta *et al.*, 2012).

Previamente, se han realizado otros estudios experimentales con la finalidad de conocer la resistencia a estos antibióticos en cepas aisladas de mascotas (perros, gatos y tortugas), cuyos resultados han reportado la presencia de cepas resistentes a betalactámicos y quinolonas, así como plásmidos conjugativos (Rocha-Gracia, 2015; Cortés-Cortés, G, 2016).

Este trabajo es el complemento del realizado por Abad y col., (2018) en su tesis de licenciatura denominada “Resistencia a antibióticos β -lactámicos y producción de BLEE, en cepas de *Escherichia coli* multirresistentes, aisladas de mascotas y sus dueños”, en donde

observó la presencia de genes que pertenecen a betalactamasas como *bla*_{TEM} en la cepa 2H, *bla*_{CTXM-15} en las cepas 2H y 2P, 17H, 17P3, 20H*, 20P*, y 21H, 21P *bla*_{SHV} en la cepa 17H. En este estudio observamos que las cepas 2P, 17P3, 20H*, 20P*, 21H y 21P presentan resistencia a quinolonas de primera y segunda generación, la cepa 2H es resistente a ácido nalidíxico pero susceptible a ciprofloxacino; además, la cepa 17H mostro resistencia a esta quinolona de segunda generación y susceptibilidad a la quinolona de primera generación. Esto sugiere que las cepas productoras de betalactamasas también pueden contener genes plasmídicos de resistencia a quinolonas de segunda generación y cromosómicos para las de primera, como se ha reportado en otros estudios (Peralta *et al.*, 2012; Famiglietti *et al.*, 2005; Medina *et al.*, 2017).

Además, se puede observar de forma general que hacia el meropenem (MEM) se obtiene el mayor porcentaje de susceptibilidad (97%) y solo la Cepa 1P mostró ser resistente al antibiótico. De esta manera se podría especular que un medicamento de última elección para el tratamiento llegue a dejar de ser eficaz, por la resistencia que pueda portar la bacteria.

Otro caso extremo es ceftriaxona (CRO), hacia el cual se obtiene el mayor porcentaje de resistencia (97%), haciendo evidente que este antibiótico deja de ser una opción para la clínica humana y veterinaria. Lo mismo se observa en la resistencia a tetraciclina (TE) que fue de un 79%, la cual se pueda deber al uso excesivo y mal uso de este bacteriostático en la comunidad o a una coselección (Roca, *et al.*, 2015).

Se obtuvieron 7 parejas de cepas de humanos y de su mascota respectiva, las cuales tuvieron, en algunos casos, porcentajes similares de resistencia a los antibióticos evaluados, además de ser resistentes a más del 50% de ellos. Sin embargo, algo que llamó la atención es que, de forma general, las cepas aisladas de perros son más resistentes que las de humano.

Se deben destacar parejas con características similares, como la conformada por las cepas 2H y 2P, que coinciden en 12 de los 18 antibióticos analizados, solo difieren en ampicilina y amoxicilina con ácido clavulánico, ya que la cepa 2P es sensible y la 2H resistente; y en imipenem, cloranfenicol, trimetoprim con sulfametoxazol y ciprofloxacino, en donde la cepa 2H muestra susceptibilidad y la cepa 2P es resistente a los cuatro antibióticos. Además se debe destacar la presencia del gen *bla*_{CTXM-15} en ambas cepas, descrito en el estudio de Abad y col., (2018).

Se pudieron relacionar 7 parejas de cepas de *E. coli* tanto de humano como de su mascota respectiva, las cuales están conformadas por las cepas: 1H, 1P, 2H, 2P, 3H, 3P, 12H*, 12P2*, 17H, 17P3, 20H*, 20P*, 21H y 21P. La pareja conformada por las cepas 20H* y 20P* muestran una similitud en la susceptibilidad y fenotipo BLEE analizadas en este estudio, lo cual sugiere que puede haber un intercambio de cepas entre ambos hospederos, con la posibilidad de encontrar la misma cepa o un intercambio de información genética entre las cepas. Por lo tanto, se sugiere la necesidad de metodologías que nos permiten conocer la información genética de estas cepas, desde la identificación de genes de resistencia, hasta la secuenciación de los mismos y de las cepas para poder hacer una comparación a nivel molecular.

El hecho de haber observado 5 parejas (2H y 2P, 12P2* y 12H*, 17H y 17P3, 20H* y 20P*, y 21H y 21P) con similitud en su perfil fenotípico de resistencia a antibióticos, nos indica que posiblemente la convivencia que se establece entre mascotas y sus dueños, incluye hábitos higiénicos erróneos, que con el afán de demostrar afecto (besos, caricias, juegos, comer y dormir juntos), al mismo tiempo promueven el intercambio de bacterias entre ellos. El problema radica cuando factores como la edad, sistema inmune bajo, enfermedades autoinmunes, la existencia de enfermedades que los mantienen bajo cuidados o tratamientos específicos exponen a las personas a ser vulnerables ante posibles enfermedades provocadas por enterobacterias multirresistentes, como las *E. coli* aisladas en este trabajo y que provienen de su mascota. Además, esto podría suceder de forma similar en las mascotas (puede ser bidireccional), ya que este intercambio de bacterias puede afectar a su microbiota y por ende a su organismo.

Los resultados de este trabajo ayudan a determinar que existe un aumento en la resistencia a antibióticos que son utilizados para combatir enterobacterias en la clínica humana y veterinaria; además sugieren, como se ha establecido en otros estudios, que pudiera existir una posible diseminación de *E. coli* multirresistentes entre las mismas especies e incluso entre distintas especies de mamíferos, lo cual es de gran inquietud para la comunidad, debido a la convivencia cercana que se llega a tener entre mascotas y humanos (Martins *et al.*, 2013). No se recomienda restringir el buen trato hacia las mascotas, si no hacer una concientización que pueda evitar los malos hábitos que tenemos como personas y como dueños de diferentes

mascotas, para así preservar en la medida de lo posible la salud de ambos hospederos. Alguno de estos hábitos se sugiere que pueden ser el frecuente lavado de manos, educar a las mascotas para que sean capaces de identificar un lugar específico para dormir, comer, defecar y orinar. De esta manera se pueden poner límites en la convivencia de ambas especies, sin la necesidad de deteriorar o modificar la relación de afecto que se establece entre ellos.

13. CONCLUSIÓN

1. El análisis fenotípico de susceptibilidad a antibióticos en cepas de *E. coli* aisladas de perros sanos y sus dueños, nos permitió apreciar que la resistencia a quinolonas, la producción de BLEE y la MDR es elevada en ambos hospederos.
2. A pesar de ser un número bajo de cepas, se demostró la relación entre algunas cepas de *E. coli* MDR y productoras de BLEE aisladas de perros y sus dueños.
3. La convivencia estrecha entre humanos y mascotas y los hábitos de ambos, pueden ser factores importantes para la diseminación de la resistencia bacteriana entre ambas especies, a través de un posible tránsito de bacterias MDR entre microbiomas intestinales.

13. PERSPECTIVAS

1. Realizar estudios biomoleculares para determinar la presencia de genes de resistencia a quinolonas, tanto cromosómicos como plasmídicos.
2. Determinar la presencia de plásmidos, y analizar la posible transmisión horizontal de genes de resistencia en las cepas estudiadas.
3. Estudiar la co-existencia de los genes codificantes de BLEE y los genes de resistencia a quinolonas en elementos genéticos movilizables.
4. Determinar el patotipo de la pareja de cepas de *E. coli* 20H* y 20P*, y 12P2* y 12H*.
5. Establecer si en las parejas con un porcentaje elevado de similitud fenotípica se aisló la misma cepa de *E. coli* en perro y su dueño.

14. ANEXOS

Anexo 1. 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

3.- ¿Su mascota convive con otras mascotas?

SI NO

4.- ¿Qué tipo de mascotas?

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

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

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

a) Dentro de la casa b) Patio c) Calle

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

SI

NO

Anexo 2. Formato de consentimiento informado **INFORMACIÓN**

¿Qué es y cómo se realiza?

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

¿Para qué 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 más resistentes a antibióticos betalactámicos, los cuales son los más 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. Pruebas de identificación bioquímica de *Escherichia coli*.

De acuerdo con los criterios de Cowan´s & Steel y de Rodriguez-Angeles se sabe que las cepas *E. coli*:

- ❖ Muestran un crecimiento aerobio y anaerobio.
- ❖ Pueden ser o no móviles
- ❖ Fermentan glucosa, lactosa y otros carbohidratos.
- ❖ Producen ácidos por la fermentación de glucosa.
- ❖ Descarboxilan lisina y ornitina
- ❖ Convierten el nitrato a nitrito
- ❖ No metabolizan la fenilalanina, ni la urea.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

>Agar triple azúcar hierro (TSI agar)

USO: Medio empleado para la identificación de enterobacterias, en base a la fermentación de los hidratos de carbono: glucosa, lactosa y sacarosa, y a la producción de ácido sulfhídrico H_2S .

FUNDAMENTO: En este agar se determina la capacidad de un microorganismo para atacar los hidratos de carbono (glucosa, lactosa y/o sacarosa), con producción o no de gas CO_2 y H_2 , junto con la producción o no de ácido sulfhídrico (H_2S) (MacFaddin, 2013).

FÓRMULA: en gramos por litro

Extracto de carne	3.0 gr
Pluripeptona	20.0 gr
Cloruro de Sodio	5.0 gr
Lactosa	10.0 gr
Sacarosa	10.0 gr
Glucosa	1.0 gr
Sulfato de hierro y amonio	0.2 gr
Tiosulfato de sodio	0.2 gr
Rojo de fenol	0.025 gr
Agar	13.0 gr
pH final	7.3 +/- 0.2

NOTAS:

>Se siembra haciendo una punción central hasta el fondo del tubo y estría en superficie.

>La lectura se efectúa después de 18 a 24 horas de incubación a 37°C. Se lee en dos partes, la reacción ocurrida en la superficie del medio corresponde al numerador (parte aerobia) y la ocurrida en la profundidad corresponde al denominador (parte anaerobia). La acidez se denomina con la letra A (color amarillo) y la alcalinidad con la K (color rojo).

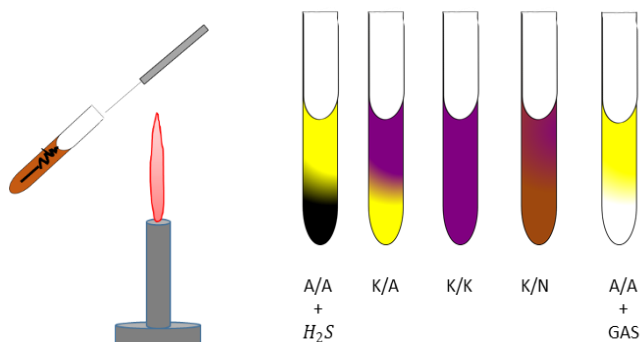
-Fermentación de glucosa K/A.

-Fermentación de glucosa, lactosa y/o sacarosa A/A.

-Producción de gas: ruptura del medio.

-Producción de H_2S ; ennegrecimiento del medio.

-No fermentación de carbohidratos K/K, la bacteria no utiliza los hidratos de carbono, produciendo aminos que alcalinizan el fondo y la superficie (Rodríguez-Angeles, 2002).



Agar lisina hierro agar (LIA)

USO: Medio de cultivo utilizado para diferenciar microorganismos, basado en la descarboxilación y desaminación de la lisina y en la producción de H_2S .

FUNDAMENTO:

En el agar LIA se determina la capacidad de un microorganismo para atacar el aminoácido lisina al descarboxilarlo o desaminarlo, la fermentación de glucosa, la producción de gas (CO_2), junto con la producción o no de H_2S (MacFaddin, 2003).

FÓRMULA: en gramos por litro

Ppetona de gelatina	5.0 gr
Extracto de levadura	3.0 gr
Glucosa	1.0 gr
Lisina	10.0 gr
Citrato de hierro y amonio	0.5 gr
Tiosulfato de sodio	0.04 gr
Púrpura de bromocresol	0.02 gr
Agar	15.0 gr
pH final	6.7 +/- 0.2

NOTAS:

>Sembrar con asa recta, por doble picadura hasta el fondo del tubo al principio y final del pico de flauta y se realiza una estría en la superficie del mismo.

>La lectura se efectúa después de 18 a 24 horas de incubación (48 horas si es necesario) a 37°C. Se lee un quebrado, en donde la reacción ocurrida en la superficie del medio corresponde a la parte aerobia (numerador) y la ocurrida en el fondo a la parte anaerobia (denominador). La acidez se denomina con la letra A (color amarillo) y la alcalinidad con la letra K (color púrpura).

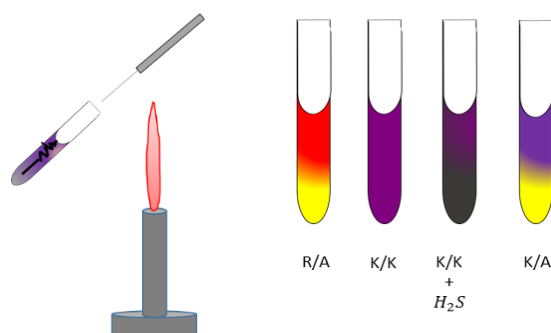
-Fermentación de glucosa K/A, la bacteria no ataca el aminoácido.

-Descarboxilación de la lisina K/K.

-Desaminación de a lisina R/A.

-Producción de gas: ruptura del medio.

-Producción de H_2S : ennegrecimiento del medio (Rodriguez-Angeles, 2002).



Agar citrato de Simmons

USO: Medio de cultivo utilizado para la identificación de enterobacterias y para su diferenciación en base a la capacidad de usar al citrato como única fuente de carbono y energía.

FUNDAMENTO: Normalmente el metabolismo del citrato comprende una condensación de acetilo con la coenzima A y oxalacetato para entrar en el ciclo de Krebs. El medio utilizado contiene también sales de amonio inorgánicas. Un organismo capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono también es capaz de utilizar las sales de amonio como única fuente de nitrógeno (MacFaddin, 2003).

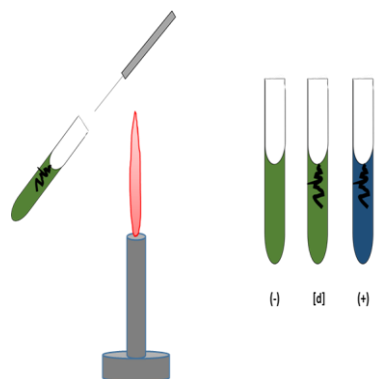
FÓRMULA: en gramos por litro

Citrato de sodio	2.0 gr
Cloruro de sodio	5.0 gr

Fosfato dipotásico	1.0 gr
Fosfato monoamónico	1.0 gr
Sulfato de magnesio	0.2 gr
Azul de bromotimol	0.08 gr
Agar	15.0 gr
pH final	6.9 +/- 0.2

NOTAS:

- >Sembrar con asa recta, solamente con una estría en la superficie del pico de flauta.
- >La lectura se efectúa después de 18 a 24 horas a 37°C.
- Cuando no hay cambio de color ni crecimiento se identifica como negativo (-).
- Si no hay cambio de color del medio, pero si hay crecimiento se identifica como [d].
- El indicador de pH es el azul de bromotimol es cual en presencia de alcalinidad vuelve el medio a un color azul mostrando un resultado positivo (+) (Rodriguez-Angeles, 2002).



Agar urea (Christensen medio)

USO: medio utilizado para la diferenciar microorganismos en base a la actividad ureásica. Por medio de la determinación de la capacidad de un microorganismo de producir ureasa y desdoblar la urea, formando 2 moléculas de amoniaco.

FUNDAMENTO: El sustrato urea es una diseminación del ácido carbónico, denominada carbamina. Todas las amidas ($RCO - NH_2$) son rápidamente hidrolizadas. La hidrólisis de la urea es catalizada por una enzima específica que es la ureasa, relacionada con la descomposición de los compuestos orgánicos. La ureasa es una enzima constitutiva ya que la sintetizan ciertas bacterias sin tener en cuenta si hay o no el sustrato urea (MacFaddin, 2003).

FÓRMULA: en gramos por litro

Tripteína	1.0 gr
-----------	--------

Glucosa	1.0 gr
Cloruro de sodio	5.0 gr
Fosfato monopotásico	2.0 gr
Rojo de fenol	0.012 gr
Agar	15.0 gr
pH final	6.8 +/- 0.2

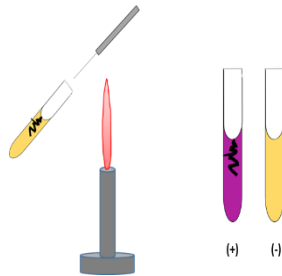
NOTAS:

>Sembrar con asa recta, solamente en la superficie del pico de flauta del tubo.

>La lectura se efectúa después de 18 a 24 horas de incubación a 37°C.

-El indicador de pH es el rojo de fenol, el cual en alcalinidad el medio vira a un color violeta indicando así un resultado positivo (+).

-Si el medio no cambia de color nos indica un color negativo (Rodriguez-Angeles, 2002).



Medio MIO (Movilidad, Indol y Ornitina)

USO: Medio utilizado en la identificación de miembros de la familia *Enterobacteriaceae* en base a la movilidad de las bacterias, producción de indol y actividad enzimática ornitina descarboxilasa.

FUNDAMENTO: Determinar si el microorganismo es móvil por migración a partir del lugar de siembra y se disemina por el medio provocando turbidez.

Las bacterias que poseen la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco. El indol desdoblado de la molécula de triptófano puede ser detectado cuando reacciona con el grupo aldehído del para-dimetil-amino benzaldehído del reactivo revelador (reactivo Kovacs).

A demás en este medio se detecta la capacidad de un microorganismo de descarboxilar al aminoácido ornitina debido a la acción de la descarboxilación en un medio ácido (Producto de una previa fermentación de la glucosa) (MacFaddin, 2003).

FÓRMULA: en gramos por litro

Glucosa	1.0 gr
Extracto de levadura	3.0 gr
Peptona	10.0 gr
Tripteína	10.0 gr
Clorhidrato de L- ornitina	5.0 gr
Púrpura de bromocresol	0.02 gr
Agar	2.0 gr
pH final	6.5 +/- 0.2

NOTAS:

>inocular tubos de este medio insertando una sola vez el asa recta aproximadamente dos tercios del tubo.

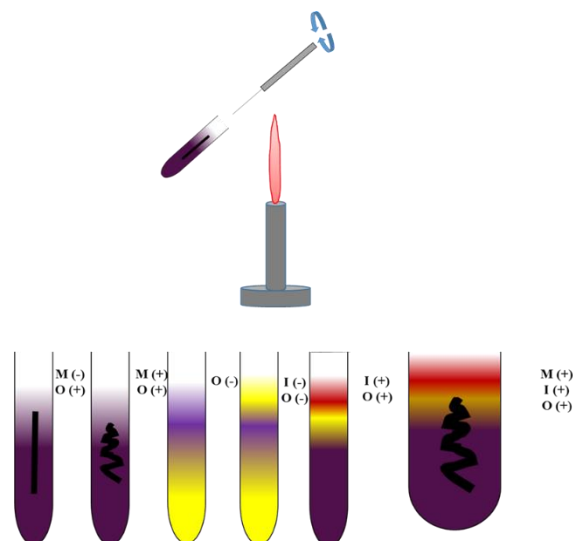
>La lectura se efectúa después de 18 a 24 horas de incubación a 35 +/- 2 °C.

* Efectuar la lectura de movilidad y actividad de descarboxilasa antes de añadir el reactivo para la detección de producción de indol.

-La movilidad se indica mediante el crecimiento que se extiende desde la línea de inoculación, Los microorganismos no móviles crecen sólo a lo largo de la línea.

-La descarboxilación de ornitina se indica mediante la visualización de un color morado turbio del medio, por lo tanto, una reacción ornitina negativa (-) se indica por un color amarillento en el medio.

-La producción de indol se indica mediante la generación de un color rosa a rojo, después de añadir 3-4 gotas de reactivo Kovacs a la superficie del medio y agitando suavemente. Una reacción indol negativa (-) se indica por la presencia de un color amarillo a la superficie del tubo (Rodríguez-Angeles, 2002).



Medio RM-VP (Rojo de metilo-Voges Proskauer)

USO: es particularmente útil para la clasificación de enterobacterias ya que determina por medio de cual vía metabólica la bacteria lleva a cabo la fermentación de la glucosa.

FUNDAMENTO: En el medio de cultivo, la pluripeptina aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano y la glucosa es el hidrato de carbono fermentable. La glucosa puede ser metabolizada por los microorganismos, a través de distintas vías metabólicas. Según la vía utilizada, se produce ácidos (ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico), o productos neutros (acetil metil carbinol).

Esta diferencia en el metabolismo, podría ser reconocida por a adición de un indicador como el rojo de metilo para revelar la presencia de productos ácidos, o por la adición de alfa naftol e hidróxido de potasio para evidenciar la presencia de productos finales neutros (MacFaddin, 2003).

FÓRMULA: en gramos por litro

Pluripeptona	7.0 gr
Glucosa	5.0 gr
Fosfato dipotásico	5.0 gr
pH final	6.9 +/- 0.2

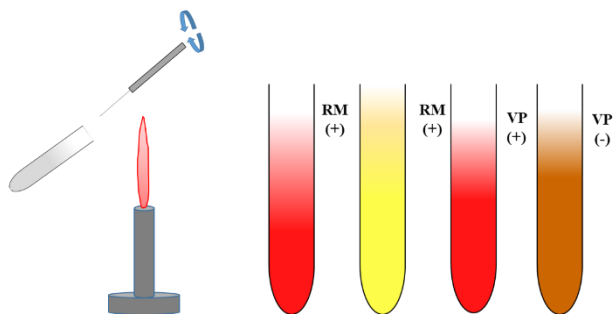
NOTAS:

>Sembrar en caldo con asa recta.

>La lectura se efectúa después de 18 a 24 horas de incubación a 37°C

-Agregar 10 gotas de rojo de metilo al tubo, la aparición inmediata de un color rojo indica que la prueba es positiva (+) para RM, pero la aparición de un color amarillo indic prueba negativa (-).

-Agregar 10 gotas de KOH al 40% y 5 gotas de alfa naftol al 5%, mezclar fuerte después de la adición de cada reactivo, esperar 15 minutos y leer, la aparición de un color rojo indica una prueba positiva (+) para VP, la aparición de un color café o amarillo indica ser negativo (-) (Rodriguez-Angeles, 2002).



Agar fenilalanina

USO: Medio de cultivo utilizado para diferenciar miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, en base a la presencia de la enzima fenilalanina desaminasa.

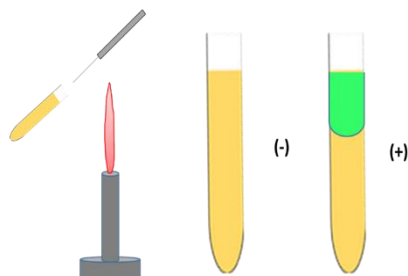
FUNDAMENTO: en este medio de cultivo, el extracto de levadura aporta todos los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo bacteriano.

El aminoácido fenilalanina es sometido a la desaminación oxidativa catalizada por la enzima fenilalanina desaminasa (una flavoproteína), para producir ácido fenilpirúvico y amoníaco. 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 Fe^{3+} . El agar es el agente solidificante (MacFaddin, 2003).

FÓRMULA: en gramos por litro

Extracto de levadura	3.0 gr
DL- fenilalanina	2.0 gr
Fosfato disódico	1.0 gr
Cloruro de sodio	5.0 gr
Agar	12.0 gr
pH final	7.3 +/- 0.2

NOTAS: Se determina la capacidad de la bacteria para diseminar el aminoácido fenilalanina en ácido fenilpirúvico por acción de la enzima fenilalanina desaminasa, esto va a producir una acidificación del medio, que se va a poner en manifiesto mediante la aplicación de cloruro férrico al 10%, si hay en el ácido fenilpirúvico aparece una coloración verde-azulada, dando un resultado positivo (+) (Rodriguez-Angeles, 2002).



ANEXO 4. PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *E.coli*

MUESTRA	TSI	LIA	M	I	O	CIT	UREA	FEN	RM	VP	BACTERIA
1H	A/A +GAS	K/K	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
1P	A/A	K/A	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
1P*	A/A +GAS	K/K	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
2H	A/A +GAS	K/K	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
2P	A/A	K/K	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
2H*	K/K	K/K	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS	NEG	
3P	A/A	K/K	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
3H	A/A	K/K	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
5H*	A/A	K/K	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
6H*	A/A	K/K	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NEG	POS	NEG	
7H	A/A	K/K	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
7P*	A/A +GAS	K/K	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
8H	K/K	K/K	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	
8H*	A/A +GAS	K/K	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
9P	A/A	K/K	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
9P*	A/A +GAS	K/K	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
12 H*	A/A	K/K	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
12P2*	A/A +GAS	K/K	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
13P*	A/A +GAS	K/K	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
17H	A/A +GAS	K/K	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	<i>E. coli</i>
17P1	A/A +GAS	K/K	NEG	POS	POS	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
17P3	A/A +GAS	K/K	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
18H	A/A +GAS	K/K	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	<i>E. coli</i>
18P	A/A +GAS	K/K	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
19 P *	A/A +GAS	K/K	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
20H	A/A	K/K	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
20H*	A/A +GAS	K/K	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
20 P*	A/A +GAS	K/K	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
20 P2*	A/A	K/K	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	
21H	A/A +GAS	K/K	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
21P	A/A +GAS	K/K	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
23P	A/A +GAS	K/K	NEG	POS	POS	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
24H	A/A +GAS	K/K	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
26P	A/A +GAS	K/K	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
27H	K/K	K/K	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	
27P	A/A	K/K +GAS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
29 H*	A/A +GAS	K/K	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
31 P*	A/A +GAS	K/K	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
32H	A/A	K/K	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
34 P*	A/A +GAS	K/K	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
36P	A/A +GAS	K/K +GAS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
37P	A/A +GAS	K/K	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>

PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE PAREJAS

MUESTRA	TSI	LIA	M	I	O	CIT	UREA	FEN	RM	VP	BACTERIA
1H	A/A +GAS	K/K	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
1P	A/A	K/A	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
2H	A/A + GAS	K/K	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
2P	A/A	K/K	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
3P	A/A	K/K	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
3H	A/A	K/K	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
12 H*	A/A	K/K	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
12P2*	A/A +GAS	K/K	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
17H	A/A +GAS	K/K	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	<i>E. coli</i>
17P1	A/A +GAS	K/K	NEG	POS	POS	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
17P3	A/A +GAS	K/K	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
18H	A/A +GAS	K/K	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	<i>E. coli</i>
18P	A/A +GAS	K/K	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
20H*	A/A +GAS	K/K	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>

20 P*	A/A +GAS	K/K	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
20 P2*	A/A	K/K	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	
21H	A/A + GAS	K/K	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
21P	A/A + GAS	K/K	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
27H	K/K	K/K	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	
27P	A/A	K/K +GAS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	<i>E. coli</i>
TSI: Agar Hiero Triple Azúcar K/K (No fermentación de carbohidratos) A/A (Fermentación de glucosa, lactosa y/o sacarosa) +GAS (Producción de gas en el medio) -LIA: Agar Hiero Lisina K/K (Descarboxilación de lisina) -CIT: Citrato -MIO: Movilidad Indol Ornitina -FEN: Fenilalanina -MR-VP: Rojo de Metilo-Voges Proskauer -Urea. (*) Cepas que corresponden al muestreo del segundo periodo.											
NO IDENTIFICADA COMO <i>E. coli</i>											
NO FUE VIABLE											
PRESENTÓ CONTAMINACIÓN											

15. BIBLIOGRAFÍA

- Aldred, K. J., Kerns, R. J., & Osheroﬀ, N. (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi5000564>
- Alouache, *et al.* (2014). Characterization of ESBLs and Associated Quinolone Resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates from an Urban Wastewater Treatment Plant in Algeria. *Microbial Drug Resistance*, 20(1), 30–38. <https://doi.org/10.1089/mdr.2012.0264>
- Bachelet, M. (2019). Una nueva herramienta para luchar contra la crisis de la resistencia a los antibióticos. *Noticias ONU*, 1–10.
- Barreto Argilagos, G. (1997). *Escherichia coli*: un reto después de 111 años de estudio. *Revista Archivo Médico de Camagüey*, 1(2), 0–0.
- Becker, N., Kunath, J., Loh, G., & Blaut, M. (2011). Human intestinal microbiota: Characterization of a simplified and stable gnotobiotic rat model. *Gut Microbes*, 2(1). <https://doi.org/10.4161/gmic.2.1.14651>
- Byarugaba, D. K. (2010). Antimicrobial Resistance in Developing Countries. In *Antimicrobial Resistance in Developing Countries* (pp. 15–27). https://doi.org/10.1007/978-0-387-89370-9_2
- Carvalho, *et al.* (2016). Resistance patterns, ESBL genes, and genetic relatedness of *Escherichia coli* from dogs and owners. *Braz. J. Microbiol.* 47(1), 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.005>.
- CLSI, 2019. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Document M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.
- Correia, *et al.* (2017). Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? *Journal of Medical Microbiology*, 66(5), 551–559. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000475>
- Cortés-Cortés, *et al.* (2016). Detection and Molecular Characterization of *Escherichia coli* Strains Producers of Extended-Spectrum and CMY-2 Type Beta-Lactamases,

- Isolated from Turtles in Mexico. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 16(9), 595–603. <https://doi.org/10.1089/vbz.2014.1725>
- Damian Farrow, Joseph Baker, and C. M. (2015). Etymologia of *E. coli*. *Emerging Infectious Diseases*, 151(8), 10–17. <https://doi.org/10.1145/3132847.3132886>
- Delfín, M., & Almanza, Á. (2010). Identificación de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias Identification of extended spectrum β -lactamases in enterobacterias. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 99(44), 516–524. Retrieved from <http://scielo.sld.cu>
- Duede *et al.* (2017). Multidrug Resistant Enteric Bacterial Pathogens in a Psychiatric Hospital in Ghana: Implications for Control of Nosocomial Infections. <https://doi.org/10.1155/2017/9509087>
- Duse, *et al.* (2015). Risk factors for quinolone-resistant *Escherichia coli* in feces from preweaned dairy calves and postpartum dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 98(9), 6387–6398. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9453>
- Famiglietti, *el al.* (2005). Consensus for antimicrobial susceptibility testing for *Enterobacteriaceae*. Subcommittee on Antimicrobials, SADEBAC (Argentinian Society of Clinical Bacteriology), Argentinian Association of Microbiology. *Revista Argentina de Microbiología*, 37(1), 57–66. Retrieved from <http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v37n1/v37n1a08.pdf>
- Fariñas, M. C., & Martínez, L. (2013). Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(6), 402–409. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.03.016>
- Fierro, F. F. (2014). Electroforesis de ADN. *Herramientas Moleculares Aplicadas En Ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos*, 27–52.

- García *et al.* (2010). Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(SUPPL. 1), 12–18. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70003-3](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70003-3)
- Karami, N., Nowrouzian, F., Adlerberth, I., & Wold, A. E. (2006). Tetracycline resistance in *Escherichia coli* and persistence in the infantile colonic microbiota. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(1), 156–161. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.156-161.2006>
- Korzeniewska, E., Korzeniewska, A., & Harnisz, M. (2013). Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 91(2006), 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.01.014>
- Lee *et al.* (2017). Antimicrobial Susceptibilities of *Enterobacteriaceae* in Community-Acquired Urinary Tract Infections during a 5-year Period: A Single Hospital Study in Korea. *Infection & Chemotherapy Infect Chemother Infect Chemother*, 4931844949(33). <https://doi.org/10.3947/ic.2017.49.3.184>
- Lopardo, H. A., Predari, S. C., & Vay, C. (2017). Manual de Microbiología Clínica de la Asociación Argentina de Microbiología vVolumen i | Bacterias de Importancia Clínica. Retrieved from <http://www.aam.org.ar/descarga-archivos/Parte21Enterobacterias.pdf>
- MacFaddin, J. F. (2003). Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. (3°; Ed. Médica Panamericana, ed.). Retrieved from <https://passvemupana.firebaseio.com/9681801547.pdf>
- Martins, *et al.* (2013). Common Phenotypic and Genotypic Antimicrobial Resistance Patterns Found in a Case Study of Multiresistant *E. coli* From Cohabitant Pets, Humans, and Household Surfaces. *Journal of environmental health*, 75 (6), 74-80. <https://www.researchgate.net/publication/235518643>
- Medina, *et al.* (2017). Resistencia Antibiótica de Enterobacterias Aisladas de Monos (*Ateles*, *Callicebus* y *Lagothrix*) en Semicautiverio en un Centro de Rescate, Perú. *Revista de*

- Investigaciones Veterinarias Del Perú, 28(2), 418–425.
<https://doi.org/10.15381/rivep.v28.i2.13073>
- Merino, L. A., & Lösch, L. S. (2014). Familia *Enterobacteriaceae*. Universidad Nacional Del Nordeste (UNNE), 1–8. Retrieved from <http://ecaths1.s3.amazonaws.com/catmicromed/APUNTE Enterobacterias.pdf>
- Munita, J. (2017). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr.* 2016 April; 4(2). VMBF-0016-2015. doi:10.1128/microbiolspec.
- Naas *et al.* (2020). Beta-Lactamase DataBase (BLDB) – Structure and Function.
- Peralta, *et al.* (2012). Impact of empirical treatment in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. bacteremia. A multicentric cohort study. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-245>
- Roca *et al.* (2015). The global threat of antimicrobial resistance: Science for intervention. *New Microbes and New Infections*, (6), 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2015.02.007>
- Rocha-Gracia *et al.* (2015). Faecal *Escherichia coli* isolates from healthy dogs harbour CTX-M-15 and CMY-2 β -lactamases. *Veterinary Journal*, 203(3), 315–319. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.12.026>
- Rodríguez-Angeles, M. G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Publica de Mexico*, Vol. 44, pp. 464–475. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342002000500011>
- Rodríguez-González, *et al.* (2020). Multidrug-Resistant CTX-M and CMY-2 Producing *Escherichia coli* Isolated from Healthy Household Dogs from the Great Metropolitan Area, Costa Rica. *Microbial drug resistance*, Vol. 00, Num. 00, pp. 1-8. Doi: 10.1089/mdr.2020.0146
- Rodríguez, G. &. (2010). Enterobacterias. *Medicine*, 10(51), 3426–3431. [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(10\)70056-1](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(10)70056-1)

- Scheepers *et al.* (2019). Principios y práctica de la electroforesis en gel de agarosa. Edvotek, 11, 3–16. <https://doi.org/10.1007/s11266-010-9160-6>
- Seija, V., & Vignoli, R. (2008). Principales grupos de antibióticos. Instituto de Higiene, 631–648. Retrieved from <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA34.pdf>
- Solberg, C. O. (2013). Medisinsk historie - Historien om antibiotika. Tidskriftet Norsk Legeforening, 133(23–24), 2502–2507.
- Tamay de Dios *et al.* (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de lapcr en tiempo real. Medigraphic, 2, 70–78.
- USDA, 2012. Programa Nacional de Acreditación Veterinaria. Recuperado de: <http://www.cfsph.iastate.edu/Educacion-Instruccion/acreditacion-veterinaria.php?lang=es>.
- Yanat, *et al.* (2017). Characterization of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants in High-Level Quinolone-Resistant *Enterobacteriaceae* Isolates from the Community: First Report of *qnrD* Gene in Algeria. Microbial Drug Resistance, 23(1), 90–97. <https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0031>