



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE PUEBLA



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
LIC. EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE *Escherichia coli* PRODUCTORAS DE  
 $\beta$ -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO, AISLADAS DE  
MASCOTAS Y SUS DUEÑOS.

TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGO:

PRESENTA  
p.QFB OMAR GONZÁLEZ CONTLA

DIRECTOR  
D. C. ROSA DEL CARMEN ROCHA GRACIA

INSTITUTO DE CIENCIAS

ASESOR INTERNO

M. C. ALEJANDRO RUIZ TAGLE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PUEBLA, PUE. FEBRERO DE 2016

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	6
ÍNDICE DE TABLAS .....	7
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>9</b>
<b>2. MARCO TEORICO .....</b>	<b>10</b>
2.1 Características generales de <i>Escherichia coli</i> .....	10
2.1.1 Identificación de <i>Escherichia coli</i> .....	11
2.2 Importancia clínica de <i>E. coli</i> .....	11
2.3 Importancia no clínica de <i>E. coli</i> .....	13
2.4 Origen de la Domesticación .....	14
2.5 Efectos en la salud animal.....	15
2.6 Efectos en la salud humana.....	15
2.6.1 Efectos positivos .....	15
2.6.2 Efectos negativos .....	15
2.7 Resistencia bacteriana.....	16
2.7.1 Transferencia de genes de resistencia .....	17
2.7.2 Conjugación.....	18
2.7.3 Transformación .....	18
2.7.4 Transducción.....	19
2.8 Resistencia a antibióticos $\beta$ -lactámico.....	23
2.9 Antibióticos $\beta$ -lactámicos .....	20
2.9.1 Mecanismo de acción de los antibióticos $\beta$ -lactámicos.....	20
2.10 Clasificación de los antibióticos $\beta$ -lactámicos .....	22
2.10.1 Penicilinas y Cefalosporinas.....	22
2.10.2 Carbapenémicos. ....	23
2.10.3 Monobactámicos. ....	23

2.11 $\beta$ -Lactamasas.....	24
2.11.1 Clasificación de las $\beta$ -lactamasas.....	24
2.11.2 Mecanismo de acción de las $\beta$ -lactamasas .....	26
2.11.3 $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) .....	26
2.12 Aminoglucósidos.....	27
2.13 Quinolonas.....	28
2.14 Tetraciclina. ....	29
2.15 Fenicoles.....	30
2.16 Trimetoprim-Sulfametoxazol.....	30
2.17 Multirresistencia o Corresistencia. ....	32
<b>3. ANTECEDENTES .....</b>	<b>33</b>
<b>4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>37</b>
<b>5. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>38</b>
<b>6. OBJETIVOS .....</b>	<b>39</b>
6.1 Objetivo general.....	39
6.2 Objetivos Específicos .....	39
<b>7. HIPOTESIS .....</b>	<b>40</b>
<b>8. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>41</b>
8.1 Tipo de estudio.....	41
8.2 Universo del estudio.....	41
8.3 Tamaño de la muestra .....	41
8.4 Sede y lugar de estudio .....	41
8.5 Criterios de selección.....	41
8.6 Recursos humanos.....	42
8.7 Recursos financieros.....	42

8.8 Diseño estadístico .....	42
<b>9. MATERIAL Y METODOS .....</b>	<b>43</b>
9.1 Diagrama general de trabajo.....	43
9.2 Materiales.....	44
9.3 Material biológico.....	44
9.4 Métodos.....	44
9.5 Obtención de muestras.....	45
9.6 Aislamiento e identificación .....	45
9.7 Lisis celular, extracción de templado de DNA bacteriano.....	47
9.8 PCR del gen <i>uidA</i> para confirmación de especie ( <i>E. coli</i> ).....	48
9.9 Fenotipo de resistencia a antimicrobianos .....	50
9.10 Método de difusión con doble disco para fenotipo BLEE.....	52
9.11 Electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE) .....	54
9.11.1 Preparación de insertos .....	54
9.11.2 Lisis bacteriana.....	54
9.11.3 Lavados de los insertos.....	54
9.11.4 Digestión enzimática.....	55
9.11.5 Preparación del gel de agarosa .....	55
9.11.6 Electroforesis .....	55
8.10.7 Tinción del gel y Visualización .....	55
<b>10. RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
10.1 Aislamiento e identificación de cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	57
10.3 Fenotipo de $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE).....	63
10.4 Electroforesis en gel de campos pulsados .....	65
<b>11. DISCUSIÓN.....</b>	<b>67</b>

<b>12. CONCLUSIONES</b> .....	70
<b>13. PERSPECTIVAS</b> .....	71
<b>14. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	72
<b>15. ANEXOS</b> .....	78

## ÍNDICE DE FIGURAS

No. De figura	Titulo	No. De pagina
Figura 1	<b><i>Escherichia coli</i> en tinción de gram</b>	<b>11</b>
Figura 2	<b>Pintura rupestre</b>	<b>14</b>
Figura 3	<b>Principales mecanismos de resistencia bacteriana</b>	<b>17</b>
Figura 4	<b>Mecanismos de transferencia horizontal de material genético</b>	<b>19</b>
Figura 5	<b>Estructura de los antibióticos <math>\beta</math>-lactámicos</b>	<b>20</b>
Figura 6	<b>Mecanismo de acción de los antibióticos <math>\beta</math>-lactámicos</b>	<b>22</b>
Figura 7	<b>Estructura química de los antibióticos <math>\beta</math>-lactámicos</b>	<b>24</b>
Figura 8	<b>Estructura de la gentamicina</b>	<b>28</b>
Figura 9	<b>Estructura del ácido nalidíxico</b>	<b>29</b>
Figura 10	<b>Estructura de la tetraciclina</b>	<b>30</b>
Figura 11	<b>Estructura del cloranfenicol</b>	<b>31</b>
Figura 12	<b>Estructura química del trimetoprim/sulfametoxazol</b>	<b>32</b>
Figura 13	<b><i>E. coli</i> en agar Levine</b>	<b>46</b>
Figura 14	<b>Esquema de colocación de sensidiscos en placa de Müller Hinton</b>	<b>52</b>
Figura 15	<b>Esquema de colocación de sensidiscos en placa de Müller Hinton para fenotipo BLEE</b>	<b>54</b>
Figura 16	<b>Crecimiento de <i>E. coli</i> en medio Levine</b>	<b>58</b>
Figura 17	<b>Crecimiento electroforesis del gen <i>uidA</i></b>	<b>61</b>
Figura 18	<b>Cepas de <i>E. coli</i> con fenotipo BLEE negativo</b>	<b>65</b>
Figura 19	<b>Cepas <i>E. coli</i> con fenotipo BLEE positivo</b>	<b>65</b>
Figura 20	<b>PFGE de las cepas de perro y dueño</b>	<b>68</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

No. De tabla	Titulo	No. De pagina
Tabla 1	<b>Patotipos de <i>E. coli</i></b>	<b>13</b>
Tabla 2	<b>Clasificación de las cefalosporinas</b>	<b>23</b>
Tabla 3	<b>Identificación de <i>E. coli</i></b>	<b>47</b>
Tabla 4	<b>Oligonucleotidos utilizados para la identificación del gen <i>uidA</i></b>	<b>49</b>
Tabla 5	<b>Mezcla de la reacción para PCR</b>	<b>49</b>
Tabla 6	<b>Condiciones de la reacción de PCR</b>	<b>50</b>
Tabla 7	<b>Antibióticos utilizados para enterobacterias</b>	<b>51</b>
Tabla 8	<b>Lista de antibióticos utilizados para el fenotipo de producción BLEE</b>	<b>53</b>
Tabla 9	<b>Resultados de las pruebas bioquímicas de las 35 cepas de <i>E. coli</i></b>	<b>60</b>
Tabla 10	<b>Perfil de resistencia a antibióticos de las cepas de <i>E. coli</i></b>	<b>62</b>
Tabla 11	<b>Fenotipo BLEE de las 34 cepas de <i>E. coli</i></b>	<b>66</b>
Tabla 12	<b>Cepas de dueño y mascotas a las que se les realizo PFGE</b>	<b>67</b>

## ABREVIATURAS

**AM:** Ampicilina  
**ATM:** Aztreonam  
**CAZ:** Ceftazidime  
**FEP:** Cefepime  
**TE:** Tetraciclina  
**IPM:** Imipenem  
**AN:** Amikacina  
**NA:** Ácido nalidíxico  
**FOX:** Cefoxitina  
**SXT:** Trimetoprim/sulfametoxazol  
**MEM:** Meropenem  
**S:** Estreptomicina  
**CIP:** Ciprofloxacino  
**GM:** Gentamicina  
**NN:** Tobramicina  
**CRO:** Ceftriaxona  
**AMC:** Amoxicilina con ácido clavulánico  
**AND:** Ácido desoxirribonucleico  
**BET:** Bromuro de Etidio  
**BLEE:**  $\beta$ -Lactamasa de Espectro Extendido  
**CTX:** Cefotaxima  
**DAEC:** *Escherichia coli* de adhesión difusa  
**EAEC:** *Escherichia coli* enteroagregativa  
**EHEC:** *Escherichia coli* enterohemorrágica  
**EIEC:** *Escherichia coli* enteroinvasiva  
**EPEC:** *Escherichia coli* enteropatógena  
**ETEC:** *Escherichia coli* enterotoxigénica  
**LIA:** Lisin iron agar (Agar de hierro y lisina)  
**MIO:** Movilidad Indol Ornitina  
**OXA:** Oxacilina  
**PBP:** Penicilin binding protein (proteína enlazadora de penicilina)  
**PCR:** Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)  
**PFGE:** Pulsed fields gel electrophoresis (Electroforesis gel de campos pulsados)  
**SHV:** Sulfhidro hidroxil variable (BLEE)  
**TAE:** Tris-Acetato- EDTA  
**Taq Pol:** *Thermophilus aquaticus* polymerase  
**TEM:** Temoniera (BLEE)  
**TSA:** Trypticasei soya agar (agar soya tripticaseina)  
**TSI:** Triple sugar iron (agar de hierro y triple azúcar)



# 1. INTRODUCCIÓN

Desde la aparición del hombre en la tierra, el perro ha sido el animal de compañía por excelencia, acompañándolo desde sus inicios hasta la época moderna, en la actualidad el perro ha tomado un papel importante en las familias alrededor de todo el mundo, debido a que es un animal muy noble, cariñoso y protector, llegando inclusive a servir de apoyo en diferentes organizaciones de seguridad pública.

En México la mayoría de las familias cuentan con mascotas en sus casas y el perro es la primera elección debido a su lealtad y para brindar protección a los hogares durante la noche.

A pesar de que el perro es considerado “El mejor amigo del hombre” este puede transmitir enfermedades que pueden dañar al ser humano, tales como la rabia, leptospirosis, parasitosis, diarreas, gripe, entre otras. Estas enfermedades son desencadenadas por la colonización de bacterias, virus o parásitos.

Una de estas bacterias ha sido *Escherichia coli*, que como se sabe se encuentra presente en la flora normal del intestino de los mamíferos, actualmente *E. coli* ha presentado, como la mayoría de las bacterias, resistencia a una gama de antibióticos que han sido aisladas de perros sanos.

El presente trabajo trata de estudiar la diseminación de *E. coli* entre mascotas y sus dueños, que han sido aisladas de muestras fecales de los mismos, observando a través del fenotipo de resistencia, la producción de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE), y ensayos de electroforesis por campos pulsados (PFGE), la probable relación clonal entre cepas aisladas de ambos hospederos.

## 2. MARCO TEORICO

### 2.1 Características generales de *Escherichia coli*

Es un bacilo gramnegativo no esporulado, anaerobio facultativo, móvil con flagelos peritricos o inmóvil, catalasa positiva y oxidasa negativa, capaz de fermentar a la glucosa y lactosa, de rápido crecimiento y mide aproximadamente de 1 a 3  $\mu\text{m}$ , con una temperatura óptima de crecimiento de 37°C, esta bacteria se encuentra distribuida en todo el mundo, en el suelo, agua, vegetales para consumo humano, y como parte de la microbiota normal en intestino de todos los animales (Drassar y Hill, 1974), aunque existen cepas que presentan factores de patogenicidad que pueden llegar a provocar enfermedades diarreicas en sus hospederos (Rodríguez, 2002).

Es una bacteria de la familia Enterobacteriaceae descrita por primera vez por el Dr. alemán Theodor von Escherich en 1885 como un microorganismo habitual en la microbiota del intestino de individuos sanos, nombrándolo inicialmente como *Bacterium coli* (Kaper *et al.*, 2004) (**Figura 1**).

En la actualidad *E. coli* es una de las especies bacterianas más estudiada por los investigadores alrededor del mundo, no sólo por su factores de patogenicidad, también es estudiada como modelo de investigación para el metabolismo, genética y en investigaciones de diversa índole (Bello, 2013).

Debido a que forma parte de la microbiota normal de intestino en humanos y animales, su presencia se considera como indicador de contaminación fecal cuando se encuentra presente en alimentos y agua para consumo humano, tiene la capacidad de proliferar rápidamente, además de que es una bacteria de fácil identificación en laboratorios de inocuidad de alimentos, de agua y en el área de microbiología clínica (Drassar y Hill, 1974).



Figura 1: *Escherichia coli* en tinción de Gram (Tomado de Kaper *et al.*, 2004)

### 2.1.1 Identificación de *Escherichia coli*

La identificación de *E. coli* se basa generalmente, en una extensa batería de pruebas bioquímicas convencionales, que permiten determinar las características de desarrollo y metabolismo.

Los métodos de identificación bacteriana requieren una colonia pura, tomada de una placa de aislamiento primario, se siembra en diferentes medios y se procede a su posterior lectura e interpretación. En la mayoría de los casos, el diagnóstico lleva tiempo y varios pasos de manipulación (**ver Anexo1**).

### 2.2 Importancia clínica de *E. coli*

*E. coli* es la especie bacteriana más común de la microbiota intestinal; se presenta como un comensal del intestino humano pocas horas después del nacimiento. Es raro encontrar cepas comensales asociadas a enfermedad (Iguchi *et al.*, 2009).

En 1944, Kauffman propuso un esquema para la clasificación de *E. coli* utilizando sueros de conejos inmunizados con las variedades de los antígenos O (somático), H (flagelar) y K (capsular). El antígeno O es un polisacárido termoestable, que forma parte del lipopolisacárido (LPS) presente en la membrana externa de la bacteria. El antígeno K corresponde al polisacárido capsular que envuelve a la bacteria. Actualmente se conocen un total de 185 antígenos somáticos, 56 flagelares y 60 capsulares. La combinación específica de los

antígenos O y H define el serotipo de una bacteria, en tanto que la identificación del antígeno somático hace referencia al serotipo de la cepa de *E. coli* (Kauffman, 1944).

La enfermedad diarreica grave (EDA), es uno de los problemas de salud pública de mayor importancia en el mundo. De acuerdo con estudios efectuados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF), las EDA son un problema de salud de la población infantil, principalmente en los países en desarrollo donde se producen anualmente entre 5 a 6 millones de muertes, constituyendo la segunda causa global de mortalidad infantil (Nataro y Kaper, 2004).

*E. coli* es responsable de aproximadamente 630 millones de casos de diarrea en el mundo y entre 5 a 6 millones de muertes al año, afectando principalmente a la población infantil de países en desarrollo. Además se ha reportado su participación en cerca del 50% de las UTI (Unidad de Tratamientos Intermedios) intrahospitalarias y en el 90% de las infecciones de este tipo en pacientes ambulatorios (Hernández, C. *et al.*, 2011).

Las cepas de *Escherichia coli* causantes de diarrea se han agrupado en seis tipos patógenos, cada uno definido por sus propiedades de virulencia: *E. coli* enteropatógena (EPEC), enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), con adherencia difusa (DAEC) y enteroagregativa (EAEC). Cada uno de los grupos patógenos de *E. coli* presenta características distintivas relacionadas con su epidemiología, patogénesis, manifestaciones clínicas y tratamiento (Rodríguez, 2002) (**Tabla 1**).

**Tabla 1:** Patotipos de *Escherichia coli*

Síndromes Clínicos	<i>Escherichia coli</i> patógenas
Enteritis/ enfermedad diarreica	<i>E. coli</i> enteropatógena- EPEC <i>E. coli</i> enterohemorrágica – EHEC  <i>E. coli</i> enterotoxigénica – ETEC  <i>E. coli</i> enteroagregativa – EAEC  <i>E. coli</i> enteroinvasiva – EIEC  <i>E. coli</i> Adherente difusa – DAEC
Infecciones del tracto urinario	<i>E. coli</i> uropatógena – UPEC

Tomada de Molina *et al.*, 2015

### 2.3 Importancia no clínica de *E. coli*

La multirresistencia en cepas de *E. coli* no solo se ha podido observar en ambientes hospitalarios, sino que también en una gran variedad de ambientes como son en suelo, agua, comida, animales de compañía, etc.

Se sabe que el medio ambiente esta colonizado por millones de bacterias, por lo que es muy común el aislamiento de cepas, no solamente en suelo, aire, agua, también en alimentos y esto es debido a que en los cultivos se ocupan aguas negras para regarlos, uno de los focos de infección más común es la manipulación de los alimentos, ya que muchas veces no se hace con las medidas de higiene necesaria, provocando que estas bacterias estén circulando en la población (Drassar y Hill, 1974).

Otro de los focos de infección son los animales, ya sean animales de granja, para consumo humano, animales de compañía o mascotas. Estos últimos al estar en contacto constante con los humanos provoca que entre ellos exista una transferencia de bacterias patógenas y no patógenas (Drassar y Hill, 1974).

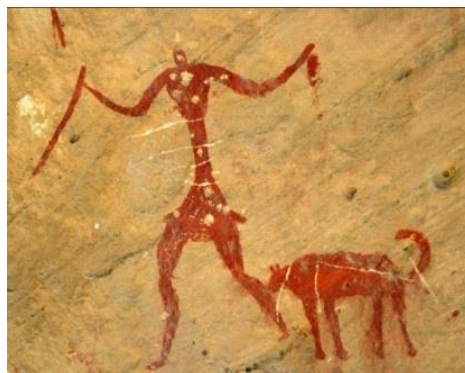
## 2.4 Origen de la Domesticación

El origen de la domesticación animal se estableció alrededor del año 9000 A.C. (**Figura 2**) en el suceso de la sedimentación humana conocido como revolución neolítica. Se comenzó a utilizar a los animales con propósitos alimenticios, pero tiempo después se descubrió que podían ser utilizados como herramienta de caza o compañeros de caza, adoptando un valor más sentimental con el hombre.

Un animal de compañía o mascota es un animal domesticado que se conserva con el propósito de brindar compañía, a diferencia de los animales de laboratorio, animales para la crianza o ganado, animales para el transporte animales para el deporte, los animales de compañía no son conservados para traer beneficios económicos o alimenticios, únicamente para un beneficio personal.

Son seleccionados por su comportamiento y adaptabilidad e interacción con los humanos, utilizados también como herramientas de caza y seguridad. Poseer un animal de compañía puede traer a la salud consecuencias positivas, los animales de compañía más populares son el perro y gato.

Son muy adaptables al ambiente del ser humano sin importar su naturaleza, pueden llegar a adherirse a un grupo, familia y sociedad, la cual le ofrece de todo lo necesario para su desarrollo.



**Figura 2: Pintura rupestre (tomado de Aguilon., 2014).**

## **2.5 Efectos en la salud animal**

Poseer un animal de compañía es frecuentemente traducido como una adquisición de responsabilidades, en la que se le debe brindar al animal todo lo necesario para su correcto desarrollo. Para el cuidado de un animal de compañía se necesita una correcta alimentación y un constante cuidado que le evite enfermedades, además de cuidado médico y la imitación de su ambiente natural.

## **2.6 Efectos en la salud humana**

### **2.6.1 Efectos positivos**

El poseer un animal de compañía puede traer efectos positivos en la vida humana. El descenso de la presión arterial alta y de los niveles de colesterol y triglicéridos en la sangre son efectos físicos positivos que puede traer el poseer un animal de compañía. La interacción social que involucra el tener un animal de compañía, ha demostrado una respuesta positiva al estrés mental, la depresión y los sentimientos de soledad, desembocando en un efecto placebo, que mejora la salud del poseedor.

Así mismo, recientes estudios en Japón muestran que las personas que sufren enfermedades crónicas y poseen animales de compañía parecen ser más saludables que quienes viven sin un animal de compañía.

En los resultados publicados en *American Journal of Cardiology*, los investigadores que estudiaron a casi 200 personas hallaron que quienes poseían un animal de compañía contaban con una mayor variabilidad de ritmo cardíaco que aquellos sin un animal en el hogar (Álvarez, 2014).

### **2.6.2 Efectos negativos**

Entre los efectos negativos en la salud por causa de los animales de compañía se enumeran principalmente las respuestas inmunes y cutáneas de alergias y asma. Otro posible riesgo es el ataque de la mascota (mordida, inyección de veneno, zarpazos, etc.), también se debe de tener en cuenta el temor

o fobia a alguna especie de mascotas. Además se pueden adquirir varias enfermedades por patógenos transmitidos a través del contacto con el animal, como infecciones estomacales, parasitosis, salmonelosis, etc.

Además de las diferentes zoonosis que pueden transmitir las mascotas, también pueden transmitir bacterias patógenas y/o resistentes a algunos antibióticos, esto puede darse cuando se le da la libertad a la mascota de deambular en el domicilio y hacer sus necesidades donde sea, existen algunas personas que incluso comen del mismo plato que sus mascotas así como besarlas. Una de las bacterias de vital importancia y que puede diseminarse muy fácilmente de especie a especie, es *E. coli*, debido a que se encuentra como flora autóctona intestinal de los mamíferos (Álvarez, 2014).

## **2.7 Resistencia bacteriana**

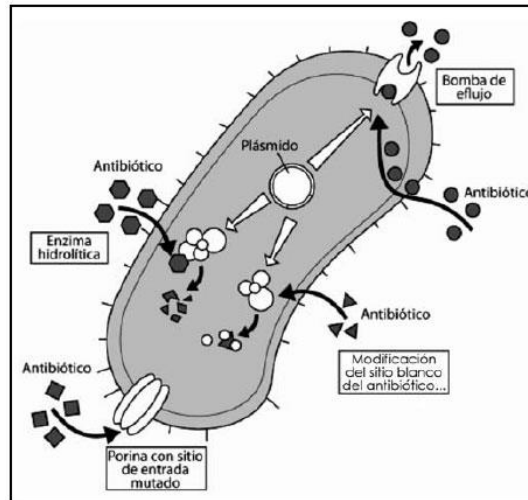
La resistencia es la capacidad que tienen las bacterias que para sobrevivir en la presencia de antibióticos, es una forma de aumentar sus posibilidades de supervivencia y proliferar en el medio ambiente, esto le confiere una ventaja evolutiva para poder preservar su linaje.

Las bacterias resistentes a antibióticos expresan mecanismos de resistencia, según la circunstancia en la que lo requieran, de acuerdo al grupo de antibiótico del cual se encuentren comprometidas, estos mecanismos se pueden agrupar en cuatro principales (Garza-Ramos *et al.*, 2009):

- a) Modificación química mediante la adenilación, acetilación y fosforilación, o hidrólisis enzimática del antibiótico
- b) Modificación del sitio blanco de la bacteria debido a mutaciones espontáneas ocurridas en los genes que codifican al blanco de acción del antibiótico (ARN polimerasa, ARN ribosomal, proteínas enlazadoras de penicilina PBP y la ADN girasa).



- c) Modificación de la permeabilidad de la membrana bacteriana debido a la sustitución de las proteínas de la membrana externa (porinas) al modificar su polaridad interna
- d) Expulsión de antibiótico debido a la sobreproducción de bombas de flujo que impiden la entrada al sitio (**Figura 3**).



**Figura 3: Principales mecanismo de resistencia bacteriana (Tomado de Moreno *et al.*, 2009)**

### 2.7.1 Transferencia de genes de resistencia

La transferencia de genes de resistencia de una bacteria a otra se lleva a cabo por medio de la adquisición de material génico extracromosómico procedente de otras bacterias.

Se realiza de forma horizontal, es decir, que la bacteria adquiere esta resistencia a través de integrones o transposones o a través de plásmidos; este tipo de transferencia no sólo permite la transmisión por generaciones, sino también permite que la bacteria que adquirió este material genético pueda presentar resistencia a otro tipo de antibióticos sin la necesidad de estar en contacto con ellos (Hart, 1998).

La transferencia horizontal de información genética entre bacterias, permite que la misma pueda adaptarse a su entorno y evolucionar. Las bacterias utilizan diferentes vías para poder transmitir la información genética que son: conjugación,

transducción y transformación; estos mecanismos de resistencia determinan la supervivencia bacteriana ya que pueden traspasar los genes de virulencia, es decir, que una bacteria que no presentaba factores de virulencia, pueda llegar a presentarlos (Moreno *et al.*, 2009).

### **2.7.2 Conjugación**

Es el proceso de transferencia de material genético entre una bacteria donadora y una receptora mediante el contacto directo por medio de un pili sexual. Descubierta por Joshua Ledenberg y Edward Tatum en 1946, es un mecanismo de transferencia horizontal de genes que se diferencia de la transformación y la transducción por el contacto entre bacterias (Hart, 1998).

Durante la conjugación la célula donadora provee un elemento genético móvil conjugativo que generalmente es un plásmido o un trasposón, la mayoría de los plásmidos conjugativos tienen sistemas que aseguran que la célula receptora no tenga ya un elemento similar.

La información genética transferida puede beneficiar a la bacteria receptora ya que puede incluir genes de resistencia a antibióticos, tolerancia a ambientes hostiles o la capacidad de usar nuevos metabolitos para obtención de energía (**Figura 4**).

### **2.7.3 Transformación**

Es la alteración genética de una bacteria que resulta de la absorción directa, incorporación y expresión del material génico exógeno, este material genético se encuentra en el ambiente y se introduce a través de la membrana bacteriana, ocurre de forma natural en algunas especies de bacterias, aunque se puede llegar a inducir de forma artificial (Hanahan, 1985).

Para que se lleve a cabo la transformación, la bacteria debe de estar en un estado de competencia, que puede ocurrir como una respuesta limitada en el tiempo o las

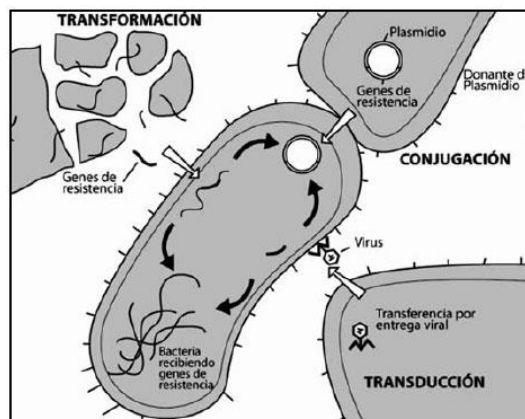
condiciones ambientales, tales como la falta de nutrientes y una densidad celular elevada. Al igual que la conjugación y la transducción, es uno de los procesos en el que el material genético exógeno puede ser introducido en una bacteria (Hanahan, 1985) (**Figura 4**).

#### 2.7.4 Transducción

Es un proceso mediante el cual el ADN es transferido a una bacteria mediante la acción de un virus, este tipo de transferencia de material genético es usualmente utilizada para introducir un gen exógeno en el genoma de una célula receptora.

Cuando los bacteriófagos infectan una bacteria, su modo normal de reproducción consiste en capturar y utilizar la maquinaria de replicación, transcripción y traducción de su hospedera para producir gran cantidad de viriones, o producir partículas virales, incluido el ADN o ARN viral y la cubierta proteica.

El bacteriófago entra en ciclo lisogénico cuando su genoma se integra en el cromosoma bacteriano, este puede permanecer latente durante varias generaciones. Si el lisógeno es inducido se inicia un ciclo lítico, que termina con la lisis de la bacteria y la liberación de nuevos bacteriófagos que infectarán a otras bacterias en la periferia (Corpet, 1998) (**Figura 4**).



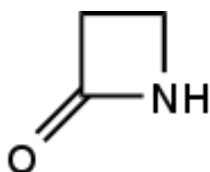
**Figura 4: Mecanismos de transferencia horizontal de materia genético (Tomado de Moreno et al., 2009)**

## 2.9 Antibióticos $\beta$ -lactámico

Un antibiótico es una molécula sintética capaz de inhibir el crecimiento bacteriano ejerciendo una acción específica sobre las estructuras o la función de los microorganismos (Vignoli y Seija, 2008).

El antibiótico  $\beta$ -lactámico es una lactama de cuatro miembros. Se le denomina como tal, debido a que el átomo de nitrógeno está unido al carbono  $\beta$  en relación con el carbonilo, también es llamado *penam* con un anillo heterocíclico que consiste en tres átomos de carbono y un átomo de nitrógeno (**Figura 5**).

Es parte de la estructura de varias familias de antibióticos denominados  $\beta$ -lactámicos. El modo de acción es la inhibición de la síntesis de la pared celular de las bacterias (Bello, 2013).



**Figura 5: Estructura principal de los antibióticos  $\beta$ -Lactámicos (Tomado de Mahoney et al., 1976)**

### 2.9.1 Mecanismo de acción de los antibióticos $\beta$ -lactámico

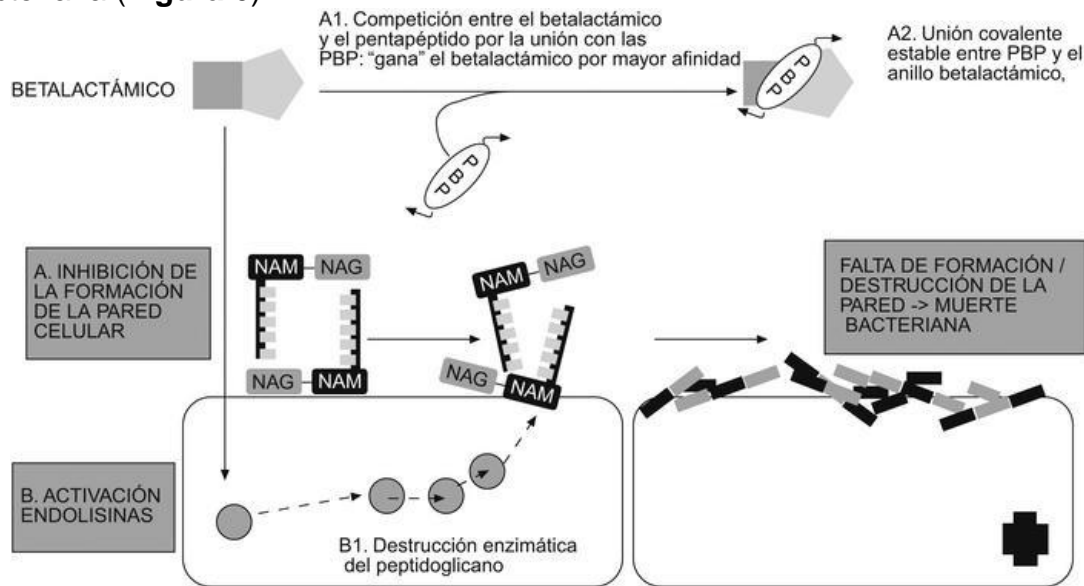
Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son bacteriolíticos de actividad lenta que actúan inhibiendo la síntesis de la barrera de peptidoglicanos en la pared celular bacteriana, que produce como consecuencia un efecto autolítico. La barrera de peptidoglicanos es importante para la integridad estructural de la pared celular, las bacterias gramnegativas tienen una pared fina y compleja que consta de una membrana externa compuesta por lípidos y proteínas, además de una membrana interna delgada de peptidoglucano. Está constituido por cadenas de glúcidos, formadas por la repetición de moléculas de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. El ácido murámico fija las cadenas de tetrapéptidos que se unen entre sí para formar una malla. Los  $\beta$ -lactámicos inhiben precisamente esta

unión o transpeptidación, de este modo esta pared queda debilitada y se puede romper por la presión osmótica intracelular, para que los antibióticos  $\beta$ -lactámicos puedan actuar es necesario que la bacteria se halle en fase de multiplicación, que es cuando ésta sintetiza la pared celular (Suarez, 2008).

El paso final de la síntesis de los peptidoglicanos, la transpeptidación, se facilita por unas transpeptidasas conocidas como "penicillin binding proteins" (PBPs, proteínas de anclaje de penicilinas). Los  $\beta$ -lactámicos son análogos de la D-alanil-D-alanina, el aminoácido terminal de las subunidades peptídicas precursoras de la barrera peptidoglicana que se está formando.

La similitud estructural que existe entre los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y la D-alanil-D-alanina facilita su anclaje al centro activo de las PBPs. El núcleo  $\beta$ -lactámico de la molécula se une irreversiblemente al PBP (Bello., 2013).

Esta unión irreversible evita el paso final (la transpeptidación) de la formación de la barrera de peptidoglicanos, interrumpiendo la síntesis de la pared. Es posible, además, que la inhibición de los PBPs (mediante dicha unión irreversible), hace también que se activen las autolisinas de la pared celular bacteriana (**Figura 6**).



NAM: Ácido N-acetilmurámico; NAG: Ácido N-acetilglucosamina; PBP: Penicillin Binding Protein

**Figura 6: Mecanismo de acción de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Tomado de Suarez, 2008)**

## 2.10 Clasificación de los antibióticos $\beta$ -lactámicos

### 2.10.1 Penicilinas y Cefalosporinas

Las penicilinas (**Figura 7**) son un grupo de antibióticos que contienen un anillo  $\beta$ -lactámico y un anillo de tiazolidina, formando el ácido 6-aminopenicililánico, que deriva de la condensación de una molécula de valina y una cisteína para dar lugar al doble anillo característico, además contienen una cadena lateral, que varía de una penicilina a otra en la posición seis del anillo  $\beta$ -lactámico y esta define las propiedades de cada una de las penicilinas de esta familia de antibióticos. Las cefalosporinas son similares a las penicilinas, con una estructura básica que está constituida de un núcleo cefem, que es la fusión de un anillo dihidrothiacinico (en el caso de la penicilina es tiazolidina) y el anillo  $\beta$ -lactámico. La codificación de las cadenas laterales es lo que origina las diversas cefalosporinas existentes. Se clasifican de acuerdo a la similitud de su actividad antimicrobiana y el orden en el cual fueron introducidos al mercado, en cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación (Andraca *et al.*, 2001). (**Tabla 2**)

**Tabla 2:** Clasificación de las cefalosporinas

Generación	Cefalosporina
Primera	-Cefazolina – Cefalotina – Cefaloridina -Cefaprina – Cefadroxil - Cefalexina - Cefadrina – Cefatrizina
Segunda	-Cefuroxima – Cefamandol – Cefonicid -Ceforamida – Moxalactan-- Cefuroxima - Cefotiam – Cefamicinas: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cefoxitina</li> <li>• Cefmetazol</li> <li>• Cefminox</li> <li>• Ceftetan</li> <li>• Cefbuperazona</li> </ul>
Tercera	-Cefotaxima –Ceftazidime –Ceftioxime -Cefoperazona -Ceftriaxona -Cefpirome - Cefixime –Cefetamet –Proxetil-cefpodoxima -Ceftibuten –Cefdinir –Cefmenoxima –Cefsulodina.
Cuarta	-Cefepime -Cefaclidina –Cefoselis -Cefelidina

Tomada de Andraca *et al.*, 2001

### 2.10.2 Carbapenémicos.

Los carbapenémicos (**Figura 7**) se constituyen de un anillo  $\beta$ -lactámico fusionado a un grupo pirrolidínico compartiendo un nitrógeno. Estas modificaciones y las cadenas laterales y la posición espacial de éstas, condiciona la mayor afinidad por las proteínas fijadoras de penicilina (PBP) diana, incrementa la potencia del espectro antibacteriano y de la resistencia a las  $\beta$ -lactamasas, siendo los  $\beta$ -lactámicos de más amplio espectro y actividad (Moreno, 2013).

### 2.10.3 Monobactámicos.

Los monobactámicos (**Figura 7**) se derivan del ácido 3-aminomonobactámico (3-AMA). Su estructura  $\beta$ -lactámica es sencilla con una estructura monocíclica donde no se encuentra fusionado el anillo  $\beta$ -lactámico a otro secundario (Marín y Gudiol, 2003)

En la actualidad existen tres inhibidores de  $\beta$ -lactamasas; el Ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. El ácido clavulánico se produce naturalmente por *Streptomyces clavulgerus*, por otra parte el sulbactam y Tazobactam derivan del ácido penicilánico relacionadas con la Penicilina (Barcelona *et al.*, 2008).

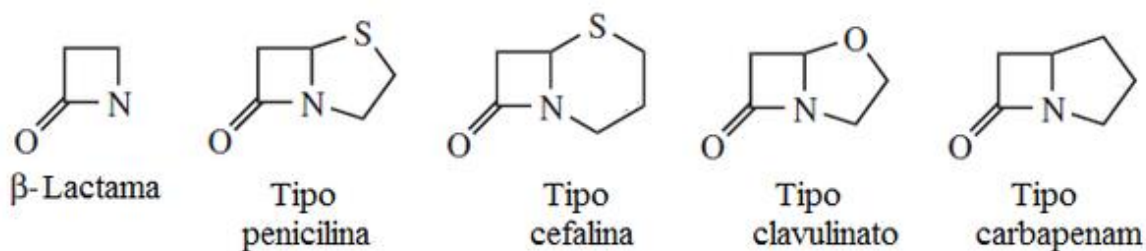


Figura 7: Estructura química de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Walsh, 2003).

### 2.11 Resistencia a antibióticos $\beta$ -lactámico

La producción de enzimas que inactivan a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos es el mecanismo más importante mediado por la enzima  $\beta$ -lactamasa y es la causa más

frecuente de resistencia antimicrobiana. Estas  $\beta$ -lactamasas pueden provenir de plásmidos o directamente del cromosoma bacteriano.

Las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas producidas en bacterias gramnegativas, conllevan a un alto nivel de resistencia y están sobretodo presente en las enterobacterias y confieren resistencia a una alta gama de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, a excepción de las cefamicinas y los carbapenémicos (Gómez *et al.*, 1992 y Hernández *et al.*, 2006).

## **2.12 $\beta$ -Lactamasas**

Son enzimas capaces de romper el anillo  $\beta$ -lactámico e inactivar al antibiótico que lo contenga, por este tipo de mecanismo algunas bacterias presentan resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, como las penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos.

Son el mecanismo de resistencia más importante en las enterobacterias. Los genes que codifican a éstas enzimas pueden encontrarse en el genoma bacteriano, en plásmidos o integrones, lo cual permite su fácil transferencia entre diferentes bacterias confiriéndoles así resistencia a bacterias que no la presentaban con anterioridad (Tafur, 2008).

Se han descrito más de 200  $\beta$ -lactamasas diferentes, algunas específicas para penicilinas (penicilinasas) o cefalosporinas (cefalosporinasas), mientras que otras poseen un amplio espectro de actividad, incluyendo a algunas que son capaces de inactivar la mayoría de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Livermore, 1995).

### **2.12.1 Clasificación de las $\beta$ -lactamasas**

Se clasifican de acuerdo a los sustratos donde actúan, las sustancias capaces de inhibirlas y la similitud en su secuencia de aminoácidos. Las clasificaciones más usadas son las de Ambler y Bush-Jacoby-Medeiros. La clasificación de Ambler en 1980 distingue cuatro clases de  $\beta$ -lactamasas (A, B, C y



D) en función de sus secuencias aminoacídicas. Las de las clases A, C y D son serin  $\beta$ -lactamasas, que poseen un residuo de serina en el centro activo y las de clase  $\beta$ -metalobetalactamasas dependientes de zinc como cofactor (Cortés *et al.*, 2006).

La mayoría de las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) contienen a serina como un aminoácido en su sitio activo y pertenece a la clase molecular A de esta clasificación, estas incluyen enzimas tales como TEM-1, SHV-1 y la penicilinasa encontrada en *S. aureus*. Este esquema fue desarrollado antes que las BLEE aumentaran y no distingue entre la original TEM o SHV y las enzimas que derivan de ellas. En 1981 Jaurin y Grundström completaron esta clasificación añadiendo la clase C: cefalosporinas con una serina en su centro activo. A finales de los 80's se agrega la clase D, que son enzimas que hidrolizan Oxacilina y se distinguen de otras  $\beta$ -lactamasas (Papanicolau *et al.*, 1990).

Por otra parte la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros separa las  $\beta$ -lactamasas en función a su perfil hidrolítico y de sus inhibidores, distinguiendo cuatro categorías y múltiples subgrupos.

El grupo 1 corresponde con la clase molecular C de Ambler, incluye cefalosporinas poco sensibles a ácido clavulánico, muchas de ellas son cromosómicas y se encuentra en *P. aeruginosa* y en algunas especies de enterobacterias (Medeiros, 1997).

En el grupo 2 se incluye un gran número de enzimas que generalmente se encuentran inhibidas por el ácido clavulánico y son mayoritariamente plasmídicas, entre estas se localizan las serin  $\beta$ -lactamasas.

Pertenecen a la clase A y C de Ambler está dividido en 8 subgrupos en función de los sustratos que hidrolizan; el subgrupo 2a incluye a las penicilinasas, el 2b las que inhiben a penicilinas y cefalosporinas, se les conoce como enzimas de amplio espectro, en este grupo se diferencian a las que presentan un espectro extendido que inactivan a la tercera generación de cefalosporinas y monobactamas (2be) y aquellas que son enzimas resistentes a los inhibidores que

derivan por mutaciones puntuales de las  $\beta$ -lactamasas TEM-1 y TEM-2 y raramente de SHV-5 (2br).

El grupo 3 incluye un grupo minoritario de enzimas portadoras de un ión zinc en su sitio activo, se les conoce como metalo- $\beta$ -lactamasas, pertenecen a la clase molecular C de Ambler y son capaces de hidrolizar diferentes tipos de sustratos incluyendo a las carbapenemasas, en su mayoría son cromosómicas pero el número de enzimas de este grupo ha aumentado al descubrirse codificadas en plásmidos en cepas de *Bacteroides fragilis*.

El grupo 4 engloba las penicilinas que no se inhiben por el ácido clavulánico, todas ellas están codificadas en el cromosoma y sin clasificación según Ambler (Watanabe *et al.*, 1991; Ito *et al.*, 1992).

### **2.11.2 Mecanismo de acción de las $\beta$ -lactamasas**

Las fases de la reacción son: Primero se asocia no covalentemente con el antibiótico para producir el complejo de Michaelis, el anillo  $\beta$ -lactámico es atacado por el hidroxilo libre del lado de la cadena con el residuo de serina en el sitio activo de la enzima produciendo un enlace éster-acyl covalente, la hidrolisis del éster finalmente libera una enzima activa y el hidrolizado. Este mecanismo de acción seguido por las  $\beta$ -lactamasas de clase molecular A, C y D, pero las enzimas de la clase molecular B utilizan un ión de zinc para atacar el anillo  $\beta$ -lactámico. (Livermore, 1995).

### **2.12.3 $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE)**

Las BLEE se caracterizan por hidrolizar penicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación (cefaloridina y cefalotina), y además hidrolizan una o más oximino-cefalosporinas, como cefotaxima, ceftazidime y aztreonam. Las BLEE se derivan de sustituciones de aminoácidos de enzimas TEM-1, TEM-2, SHV-1; sin embargo, recientemente ha proliferado un nuevo grupo de enzimas CTX-M, relacionadas con  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de *Kluyvera*. Como el

nombre lo implica, la mayoría de enzimas CTX-M hidrolizan con mayor rapidez a cefotaxima que a ceftazidima; adicionalmente, a diferencia de las enzimas TEM y SHV, las enzimas CTX-M son inhibidas mejor por el tazobactam que por el ácido clavulánico.

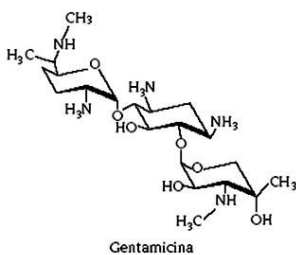
Aunque estas enzimas son producidas por diversos géneros de bacterias gramnegativas, la prueba para la detección de BLEE sólo ha sido estandarizada para especies de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis* (Cavalieri *et al.*, 2005).

En los últimos años se ha producido una explosión a escala mundial de familias BLEE de un linaje que no es TEM, ni SHV, ni OXA, por ejemplo las familias CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES, entre otras.

### **2.13 Aminoglucósidos**

Son un grupo de antibióticos que derivan de las bacterias del orden actinomicetales, del género *Streptomyces* y del genero *Mecronospora*.

Su estructura está definida por dos o más aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un anillo aminociclitol (**Figura 8**), actúan a nivel de ribosomas en la subunidad 30S y en algunas extensiones de la subunidad 50S de la bacteria y por consecuencia, a nivel de síntesis de proteínas, dando así una lectura correcta del código genético bloqueando la síntesis proteica de las bacterias, aún se desconoce el mecanismo de muerte de la bacteria, ya que no se ha logrado explicar cómo la inhibición de la síntesis de las proteínas provoca la muerte bacteriana. Son activos solo frente a bacilos aerobios gramnegativos y estafilococos, presentando poca actividad ante estreptococos y anaerobios (Vignoli y Seija, 2008).



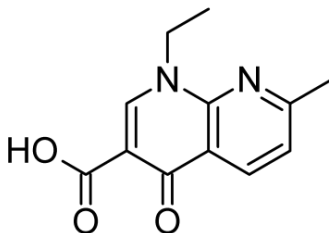
**Figura 8: Estructura de la gentamicina (Tomado de Mercado *et al.*, 2007)**

## 2.14 Quinolonas.

Son un grupo de agentes sintéticos con actividad antimicrobiana con toxicidad selectiva, la mayor parte de las quinolonas usadas son del grupo de las fluoroquinolonas, que se caracterizan por tener un grupo fluoruro en el anillo central normalmente en posición seis (**Figura 9**).

Existen cuatro generaciones de quinolonas usadas como agentes quimioterapéuticos, entre ellos se encuentra el ácido nalidíxico, el ciprofloxacino, el ofloxacino, el moxifloxacino y el levofloxacino, que usualmente se utilizan contra microorganismos resistentes a antibióticos.

Las quinolonas de primera y segunda generación inhiben selectivamente el dominio ligasa de la ADN girasa (topoisomerasa II) dejando intacto el dominio nucleasas. La actividad ADN girasa en las bacterias gramnegativas es constante y esencial para el mantenimiento del DNA bacteriano, ya que la actividad nucleasa y la acción del dominio ligasa produce la fragmentación del DNA de la bacteria (Cué y Morejón., 1998)



**Figura 9: Estructura del ácido nalidíxico (Tomado de Mella *et al.*, 2000)**

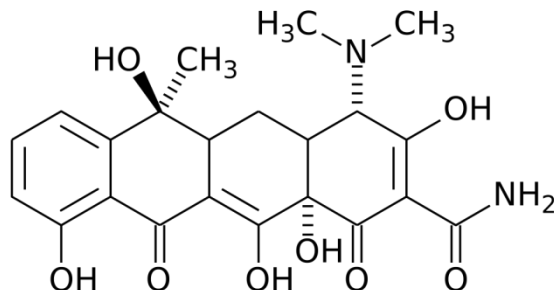
## 2.15 Tetraciclina.

Es un grupo de antibióticos obtenidos de dos formas naturalmente y por semi síntesis, que abarcan un amplio espectro de actividad bacteriana. Son derivados de  $\alpha$ -naftacenocarboxamida policíclica, núcleo tetracíclico, de donde deriva el nombre del grupo (**Figura 10**).

Se extraen de forma natural de las bacterias del género *Actinomices spp* y de *Streptomyces spp*. Aunque también se puede obtener de forma semi sintética.

Las tetraciclinas inhiben la síntesis de proteínas, actúan a nivel de ribosoma, para que tengan acceso a éste es necesario su difusión pasiva por la membrana exterior a través de poros hidrófilicos, en algunos casos se requiere de un segundo proceso dependiente de energía que transporta activamente a todas las tetraciclinas a través de la membrana citoplasmática interna. Una vez en el interior de la célula inhiben la síntesis de proteínas y se ligan a la subunidad 30S de los ribosomas, impidiendo el acceso del aminoacil ARNt al sitio aceptor del complejo ARNm-ribosomal, y esto tiene como consecuencia la no adición de aminoácidos a la cadena peptídica en crecimiento (Mendoza *et al.*, 2011).

La resistencia a tetraciclina es mediada por plásmidos, debido a esto las bacterias se vuelven resistentes después de su exposición a este antibiótico, esto implica que es posible que se pueda transferir a otras células, diseminando la resistencia a tetraciclina en otras bacterias (García, 1997).

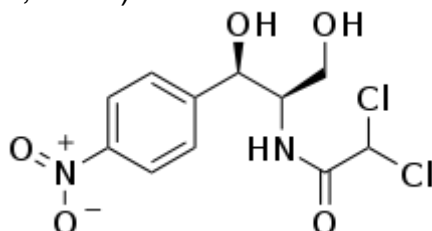


**Figura 10: Estructura de tetraciclina (Tomado de Moreno *et al.*, 2007)**

## 2.16 Fenicoles

Derivados del ácido dicloroacético, el cloranfenicol posee un grupo nitro en posición para del anillo bencénico; este es sustituido por otro sulfometil en el tianfenicol, ambos fármacos se fijan a la subunidad 50S del ribosoma tras penetrar por difusión facilitada en el citoplasma bacteriano. La unión al ribosoma se realiza de tal forma que impide la fijación del aminoacil ARNt, por lo que se detiene la síntesis proteica (**Figura 11**).

La consecuencia para la bacteria sensible es la inhibición de su multiplicación, por lo que el efecto es bacteriostático. El mecanismo de resistencia bacteriana más importante es la elaboración de enzimas inactivantes. Se trata de acetiltransferasas capaces de acetilar el cloranfenicol utilizando como fuente la acetil coenzima A y transformarlo en derivados inactivos este mecanismo de resistencia es extracromosómico. Existe también resistencia cromosómica que consiste en el incremento de la impermeabilidad de la bacteria para el antibiótico (Mediavilla *et al.*, 2008).



**Figura 11: Estructura del cloranfenicol (Tomado de Mediavilla *et al.*, 2008).**

## 2.17 Trimetoprim-Sulfametoxazol.

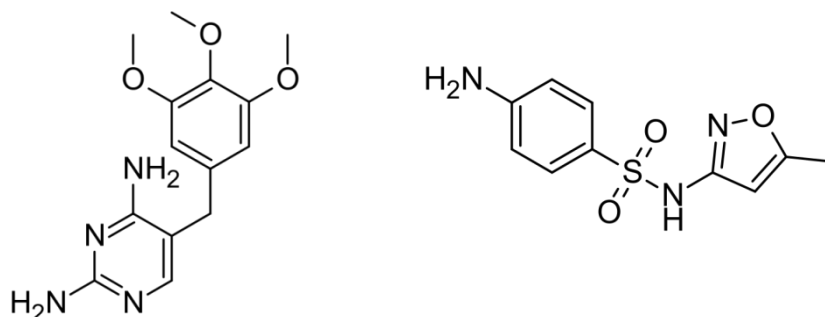
Son dos tipos de antibióticos que por su actividad complementaria suelen usarse simultáneamente en una relación de 1:5 es decir, 1 mg de trimetoprim y 5 mg de sulfametoxazol (**Figura 12**).

Esta combinación constituyó un progreso importante en la obtención de antibióticos eficaces. La trimetoprima es derivada de la trimetoxilbenzilpirimidina, mientras que el sulfametoxazol es una sulfonamida de acción intermedia, ambos

actúan en la ruta de síntesis del tetrahidrofolato, cuya inhibición provoca que las bacterias afectadas no puedan sintetizar purinas.

La síntesis de tetrahidrofolato se inicia a partir del ácido p-aminobenzoico. Precisamente a este nivel actúa el sulfametoxazol, que bloquea la enzima responsable de la síntesis debido a su parecido estructural, después se unen dos moléculas de dihidrofolato en una sola de tetrahidrofolato y es en este paso donde actúa la trimetoprima, ya que es análoga al dihidrofolato, por lo que bloquea la enzima responsable de la unión, esta reacción tiene un efecto altamente tóxico en el ser humano, pero debido a que la afinidad de las bacterias por la trimetoprima es mucho más elevada que la de las células humanas, se pueden utilizar dosis lo suficientemente bajas para que no hagan daño al organismo humano mientras que son lo suficientemente altas como para interferir el metabolismo de las bacterias (Mandel y Petri, 1997).

Las bacterias no son capaces de extraer el tetrahidrofolato del medio, por lo que dependerán de su propia síntesis para conseguirlo. Evitar esta síntesis termina originando un déficit metabólico en la bacteria, facilitando su muerte e impidiendo su reproducción, tratándose de un antibiótico bacteriostático en cuanto a su mecanismo de acción (Mandel y Petri, 1997).



**Figura 12: Estructura química del trimetoprim y el sulfmetoxazol (Tomado de Mendel y Petri 1997)**

## 2.18 Multirresistencia o Corresistencia.

La característica más importante de las BLEE es que son mediadas por plásmidos y estos les confieren una gran capacidad de diseminación entre diferentes especies de bacterias. Además de que el mismo plásmido donde se encuentran los genes de las BLEE's, puede contener diversos genes que codifican para resistencia a quinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas y trimetoprim/sulfametoxazol, lo cual conlleva a presentar resistencia a diversas familias de antibióticos provocando el difícil tratamiento de las personas que porten este tipo de bacterias (Tafur *et al.*, 2008).

Por este motivo actualmente se ha visto un incremento en la resistencia a más de tres diferentes grupos de antibióticos, obteniendo el nombre de bacterias multirresistentes.

Algunos genes que codifican para las  $\beta$ -lactamasas pueden también contener genes de resistencia a otras familias de antibióticos, como las fluoroquinolonas, aminoglucósidos, sulfonamidas, trimetoprim, entre otros; en estos plásmidos se han descrito elementos genéticos tales como secuencias de inserción, integrones y transposones que pueden estar involucrados en el reclutamientos de genes de resistencia (Celis *et al.*, 2009).



### 3. ANTECEDENTES

En 1988 Matsumoto y colaboradores reportaron la inducción de resistencia a cefotaxima en una cepa de *E. coli*, que fue aislada de la flora normal de intestino de perros de laboratorio, que habían estado en contacto con antibióticos  $\beta$ -lactámicos; esta bacteria poseía un gen que codificaba para una  $\beta$ -lactamasa denominada CTX-M (Matsumoto *et al.*, 1999).

El primer reporte de bacterias productoras de BLEE de la familia de las *Enterobacteriaceae* en España, fue en el 2000 donde Teshager y colaboradores aislaron una cepa de *E.coli* de un perro con infecciones recurrentes en tracto urinario (Teshager *et al.*, 2000).

Posteriormente en 2002 Briñas y colaboradores, reportaron la presencia de *E. coli* productoras de BLEE que fueron resistentes a ampicilina en España en cepas aisladas de cerdo, mascotas, caballos y toros, de las cuales ocho cepas de cerdo eran productoras de BLEE y de las cepas de mascota, caballo y toros, una cepa fue productora de BLEE (Briñas *et al.*, 2002)

En 2003 Briñas y colaboradores reportaron cepas de *E. coli* aisladas de muestras fecales de pollos sanos donde tres de cinco cepas producían BLEE (Briñas *et al.*, 2003)

En 2004 Costa y colaboradores reportaron cinco cepas de *E. coli* que fueron aisladas de muestras fecales de mascotas en Portugal, cuatro de ellas provenían de perros y una de gato, y que fueron resistentes a cefalosporinas, las cuatro cepas de perro presentaron el fenotipo BLEE mientras que la de gato no lo presentó (Costa *et al.*, 2004)

En 2005 Briñas y colaboradores reportaron 2,4% de cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de animales enfermos, y 6,3% de cepas de *E. coli* que producían BLEE aisladas de animales sanos en España (Briñas *et al.*, 2005).

Igualmente en 2005 Sidjabat y colaboradores reportaron la presencia de *E. coli* multidrogo-resistente que fueron aisladas de perros hospitalizados en Australia, de las cuales once cepas contenían el fenotipo BLEE del tipo CMY, siendo éste el primer reporte de este tipo en Australia, de esta forma se empezó a sospechar que los perros podrían estar siendo un reservorio importante de genes de resistencia y que pueden estar siendo transferidos entre bacterias de la flora autóctona intestinal de ambos hospederos a través de elementos genéticos móviles como los plásmidos (Sidjabat *et al.*, 2005)

En 2006 Costa y colaboradores encontraron nueve cepas de *E. coli* productoras de BLEE que fueron aisladas de diferentes animales salvajes de Portugal, cinco de estas cepas fueron aisladas de aves rapaces, dos de ciervos, una de zorro y una de búho (Costa *et al.*, 2006)

Chah y Oboegbulem en 2007 reportaron 16 cepas de *E. coli* con el fenotipo positivo en la producción de BLEE, aisladas de pollos comerciales en Nigeria, dejando en manifiesto que los pollos pudieran ser reservorios de cepas de *E. coli* productoras de BLEE y que pueden ser transferidas al humano y a otros animales (Chah y Oboegbulem, 2007).

En este mismo año Girlich y colaboradores detectaron BLEE en doce cepas de *E. coli* aisladas de pollos sanos en Francia. Sidjabat y colaboradores reportaron en 2007 nueve cepas de *Enterobacter spp* productoras de BLEE que fueron aisladas de perros en un hospital veterinario en Australia, siendo este el primer reporte de cepas de *Enterobacter spp* aisladas de perros con genes que pueden transmitirse por medio de plásmidos, representando un importante reservorio de genes de resistencia con potencial de diseminación a otros géneros y especies bacterianas (Girlich *et al.*, 2007)

Torres en 2007 plantea el incremento de la detección de BLEE en cepas de *E. coli* en animales sanos destinados para consumo humano, así como de animales de compañía principalmente perros e incluso animales salvajes, aislados en Europa, Asia y Australia; hace referencia a que el intestino de los animales

sanos es un reservorio de bacterias productoras de BLEE, principalmente de *E. coli* y posiblemente pueda actuar en la transferencia de estos genes al humano (Torres, 2007).

En 2008 Poeta y colaboradores aislaron cepas de *E. coli* a partir de muestras fecales de gaviotas en una reserva natural de Portugal, encontrando once cepas productoras de BLEE. En este mismo año Moreno y colaboradores reportaron catorce cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de perros y gatos tratados con enrofloxacina, constituyendo el primer reporte de bacterias productoras de BLEE en Chile, poniendo en evidencia que estas bacterias constituyen un hecho importante en la salud pública (Poeta *et al.*, 2008).

Moodley y Guardabassi en 2009 aislaron cepas de *E. coli* productoras de BLEE en cincuenta y seis cerdos y tres granjeros en dos granjas de Dinamarca. Este fue el primer reporte en el cual se relacionó la diseminación de bacterias de una especie a otra (Moodley y Guardabassi , 2009).

En 2010 O'keefe y colaboradores reportaron la presencia de *E. coli* productoras de BLEE en el tracto urinario de perros y gatos en los Estados Unidos, aislando once cepas en total las cuales presentaron diferentes tipos de BLEE. Este estudio contribuye al primer reporte de bacterias productoras de BLEE en perros y gatos en los Estados Unidos (O'keefe *et al.*, 2010).

Literak y colaboradores durante el 2010 aislaron cepas de *E. coli* a partir de muestras fecales de aves marinas en las costas del mar Báltico en Polonia y encontraron que nueve de las cepas aisladas producían BLEE y mencionaron que incluso en poblaciones de aves salvajes que no están involucradas con la práctica de consumo de antibióticos se han encontrados bacterias multiresistentes (Literak *et al.*, 2010)

Mamza y colaboradores en 2010 reportaron cepas de *E. coli* aisladas de pollos de granja en Nigeria de las que el 11% de las cepas estudiadas produjeron fenotipo de producción de BLEE. Ewers y colaboradores en este mismo año reportaron la presencia de BLEE en cepas de *E.coli* en animales de compañía en

Alemania, nueve eran en perro y una de caballo, esto aumentó el interés por evidenciar la transmisión inter especies de cepas multirresistentes de animales a humano y viceversa (Mamza *et al.*, 2010)

Shaheen y colaboradores aislaron cincuenta y cuatro cepas de *E. coli* en 2011 que producían el fenotipo de resistencia BLEE en animales de compañía y de laboratorio de diagnóstico veterinario de todo Estados Unidos, todos los asilamientos contenían BLEE del tipo CTX-M (Shaheen *et al.*, 2011)

En 2013 Huber y colaboradores reportaron por primera vez en Suiza ocho cepas de *E. coli* productoras de BLEE de cuatro animales diferentes, dos perros y dos gatos. En este mismo año Radhouani y colaboradores en Portugal aislaron dos cepas de *E. coli* cefotaxima-resistentes en ejemplares de zorro rojo en un ecosistema salvaje y ambas fueron productoras de BLEE (Huber *et al.*, 2013)

En 2015 Rocha y colaboradores aislaron trece cepas *E. coli* cefotaxima-resistentes en perros sanos de la ciudad de Puebla, México. De estas trece cepas, tres mostraron el fenotipo BLEE del tipo CTXM-15 y CMY-2 y diez cepas presentaron multirresistencia, una de estas cepas presentó resistencia a solo algunas cefalosporinas y penicilinas, mientras que las dos restantes resultaron sensibles a todos los grupos de antibióticos (Rocha-Gracia *et al.*, 2015)

Estos antecedentes son indicativos de que la diseminación de cepas de *E. coli* resistentes puede estarse dando a través de mascotas de compañía, hacia sus dueños y viceversa y que puede esparcirse a diferentes nichos ecológicos

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las cepas *E. coli* como patógeno entérico, y en particular los enteropatógenos clásicos son la causa principal de diarrea en los países pobres (Torres *et al.*, 2001)

Los antibióticos han sido usados para controlar y tratar infecciones bacterianas en todo el mundo: sin embargo, una de las limitaciones de su uso es la resistencia a los mismos, originada como el uso empírico e indiscriminado de dichos fármacos (Schroeder *et al.*, 2002)

Estamos ante bacterias multirresistentes con presencia de BLEE, desde un punto de vista epidemiológico su principal reservorio es el tracto digestivo, las cuales se han extendido por todo el mundo y muchas veces generan brotes epidémicos: además constituyen una amenaza para la evolución favorable de las infecciones, tanto hospitalarias como adquiridas en la comunidad (Gobernado, 2005)

La diseminación de estas bacterias a diferentes nichos ecológicos ha llevado a la necesidad de estudiar a *E. coli* en diferentes medios, como lo es el agua, alimentos y animales de compañía: estos últimos por el contacto cercano que tienen con el humano, y como lo describe muchos estudios alrededor del mundo, representan un reservorio importante de cepas multirresistentes, por lo que se debe establecer medidas de control (Bello, 2013)

## 5. JUSTIFICACIÓN

En México los reportes sobre cepas de *E. coli* productoras de BLEE se enfocan principalmente al estudio de cepas aisladas a partir de muestras clínicas de pacientes hospitalizados, por lo que existen pocos reportes de cepas multirresistentes aisladas a partir de otros orígenes, como animales de compañía.

Actualmente, es cada vez más frecuente que la mayoría de las familias cuenten con una mascota, siendo el perro la más recurrente, con el mayor contacto y libertad de movimiento dentro de los hogares, en donde muchas veces no se toman las medidas de higiene necesarias al momento de manipularlas, lo que pudiera provocar un intercambio de flora bacteriana entre la mascota y su dueño.

En esta transmisión de bacterias, pueden llegar a diseminarse bacterias multirresistentes y patógenas a través de las heces del animal al ambiente, lo cual representa un serio problema para la salud humana, convirtiendo al perro en un probable reservorio de bacterias multirresistentes productoras de BLEE.

Lo anterior hace necesario realizar estudios enfocados a la búsqueda de cepas de *E. coli* multirresistentes productoras de BLEE en flora intestinal de humanos y su mascota, con la finalidad de evidenciar la probable diseminación de alguna clona de importancia epidemiológica, entre ambos hospederos.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

- ❖ Identificar cepas de *E. coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido , aisladas de mascotas y sus dueños

### 6.2 Objetivos Específicos

- Aislar e identificar cepas de *E. coli* presuntamente resistentes a CTX, a partir de heces de perros y sus dueños.
- Determinar la susceptibilidad antimicrobiana a las cepas de *E. coli* identificadas.
- Determinar el fenotipo de producción de BLEE en las cepas de *E. coli*.
- Determinar la relación clonal de algunas cepas mediante PFGE.

## 7. HIPOTESIS

El constante contacto entre el humano y su mascota favorece el intercambio de cepas de *E. coli* resistentes y productoras de BLEE, compartiendo el fondo genético de multirresistencia.



## **8. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

### **8.1 Tipo de estudio**

El presente trabajo de tesis se realizó bajo los criterios de un estudio transversal, prospectivo y descriptivo.

### **8.2 Universo del estudio**

Se realizó en personas dueñas de mascotas y perros sanos, que no hubieran consumido antibiótico en los últimos 3 meses.

### **8.3 Tamaño de la muestra**

El tamaño de las muestras fue de 104 muestras, 52 de dueños y 52 de mascotas.

### **8.4 Sede y lugar de estudio**

El estudio se realizó en la Ciudad de Puebla, México durante el período de Enero a Junio de 2015 y las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad, del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la BUAP.

### **8.5 Criterios de selección**

Dentro de los criterios de inclusión y exclusión se contempló que la muestra se trasladara en condiciones óptimas es decir, en tubo falcón con medio de transporte Stuart y un hisopo estéril con el algodón completamente sumergido en el medio, además de transportarse a una temperatura de 4° C, y ser procesada en las primeras 24 h después de su toma. La muestra se tomó a la persona que tuviera el mayor contacto con la mascota. Toda muestra que no cumpliera con estas características fue descartada.

## **8.6 Recursos humanos**

Alumno: Omar González Contla. Profesores: D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia y M.C Alejandro Ruíz Tagle.

## **8.7 Recursos financieros**

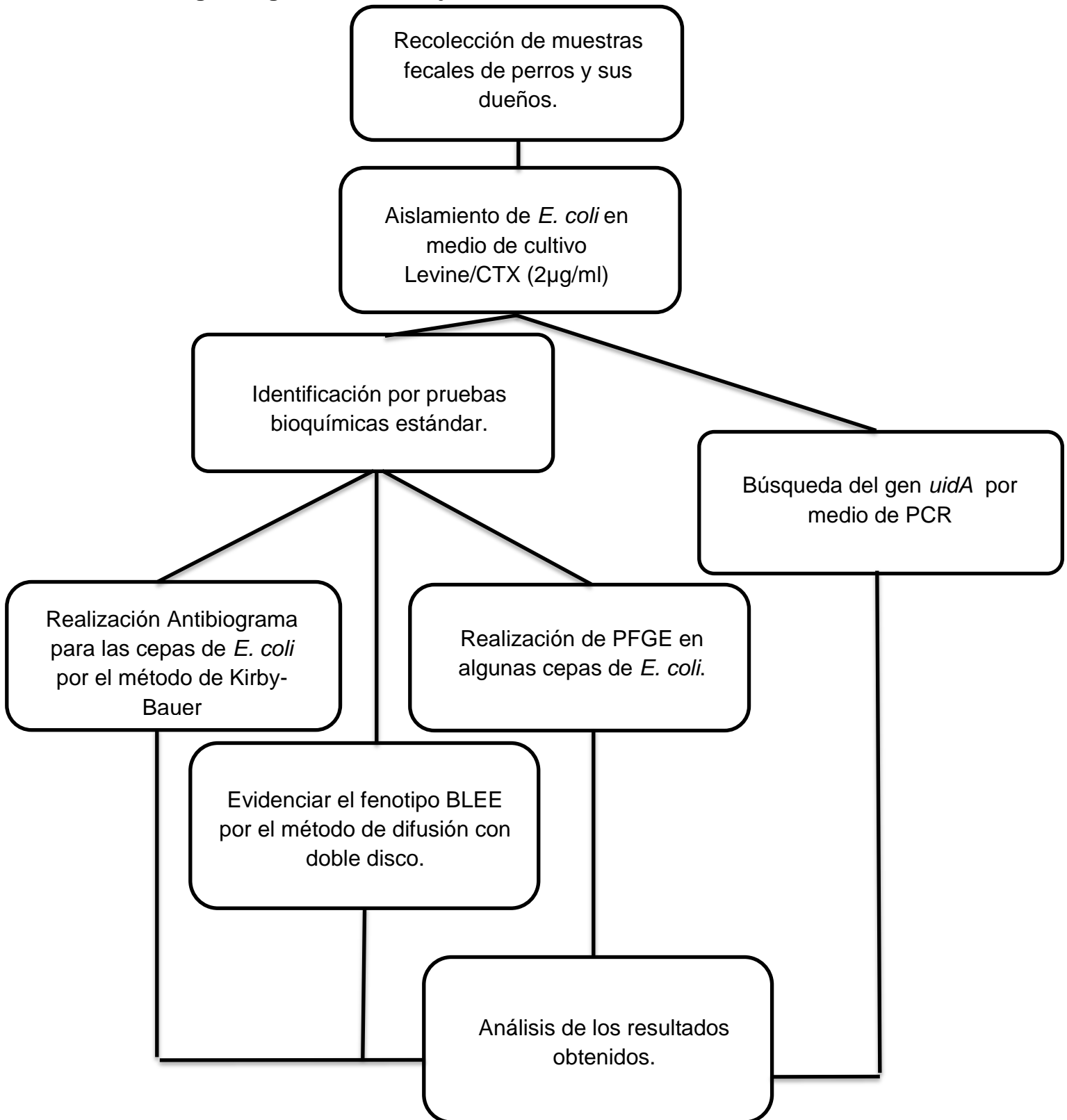
Este trabajo fue financiado por el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad, del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la BUAP y por la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la BUAP a través del Programa Institucional de Fomento a la Investigación y a la Consolidación de Cuerpos Académicos dentro del Subprograma de aseguramiento a investigadores consolidados, Convocatoria 2015. Proyecto: ROGR – NAT- 15 G.

## **8.8 Diseño estadístico**

El presente trabajo tuvo un diseño estadístico no paramétrico.

## 9. METATERIAL Y METODOS

### 9.1 Diagrama general de trabajo



## 9.2 Materiales.

- Material de vidrio necesario para la preparación de medios.
- Medios de cultivo, Agar Soya Tripticaseina, Levine con 2µg/mL de cefotaxima, Infusión Cerebro Corazón, Müller-Hinton, Medio de transporte Stuart, TSI, LIA, MIO, Citrato, Urea, Fenilalanina, VP.
- Medidor de concentración de DNA Nanodrop.
- Fotodocumentador UV Minibis®.
- Termociclador Biometra.
- Los ensayos realizados se realizaron en el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas.

## 9.3 Material biológico.

- Muestras fecales de humanos y mascotas en medio de transporte Stuart.
- Cepa control *E. coli* C7200 para realizar la PCR del gen *uidA*.

## 9.4 Métodos.

- Aislamiento por el método de estría cruzada en placa.
- Identificación de Cepas por medio de pruebas Bioquímicas.
- Método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
- Fenotipo de resistencia por el método de Kirby-Bauer.
- Fenotipo de producción de BLEE por el método de difusión con doble disco.
- Electroforesis de campos pulsados.

## 9.5 Obtención de muestras

El muestreo se realizó en la zona urbana de la ciudad de Puebla, se recolectaron un total de 52 muestras tomadas de un hisopado directo de las heces tanto de dueños como de sus mascotas, con hisopo estéril y se transportaron al laboratorio en el medio de transporte Stuart a una temperatura de 4°C, para procesarlas posteriormente. Se obtuvieron algunos datos del dueño de la mascota: edad, sexo y se preguntaron datos acerca de su mascota como: raza, alimentación, donde duerme, donde defeca y orina (**Ver Anexo 2**).

## 9.6 Aislamiento e identificación

Las muestras del hisopado directo de las heces, se sembraron por estría cruzada en Agar Levine con Cefotaxima (2µg/mL), las placas se incubaron a una temperatura de 37° C por 24 h, después se seleccionaron aquellas cepas que presentaron una morfología característica de *E. coli* en este medio de cultivo (cepas con un brillo verde metálico) ( **Figura 13**), las cepas seleccionadas se resembraron con la finalidad de purificarlas de nuevo en Agar Levine durante 24 h a una temperatura de 37° C, una vez que se obtuvieron los cultivos puros de las posibles cepas de *E. coli* se tomó una colonia y se sembró en Agar TSA (soya tripticaseína, Bioxon®) incubándolo por 24 h a una temperatura de 37° C. Partiendo de la siembra en TSA, las cepas se guardaron en crioviales que contenían una mezcla de BHI (infusión cerebro corazón, Bioxon®) con glicerol al 10 % para mantener las cepas viables a una temperatura de -70° C para su identificación posterior mediante pruebas bioquímicas (**Tabla 3**) y amplificación del gen *uidA* (**Diagrama 2**).



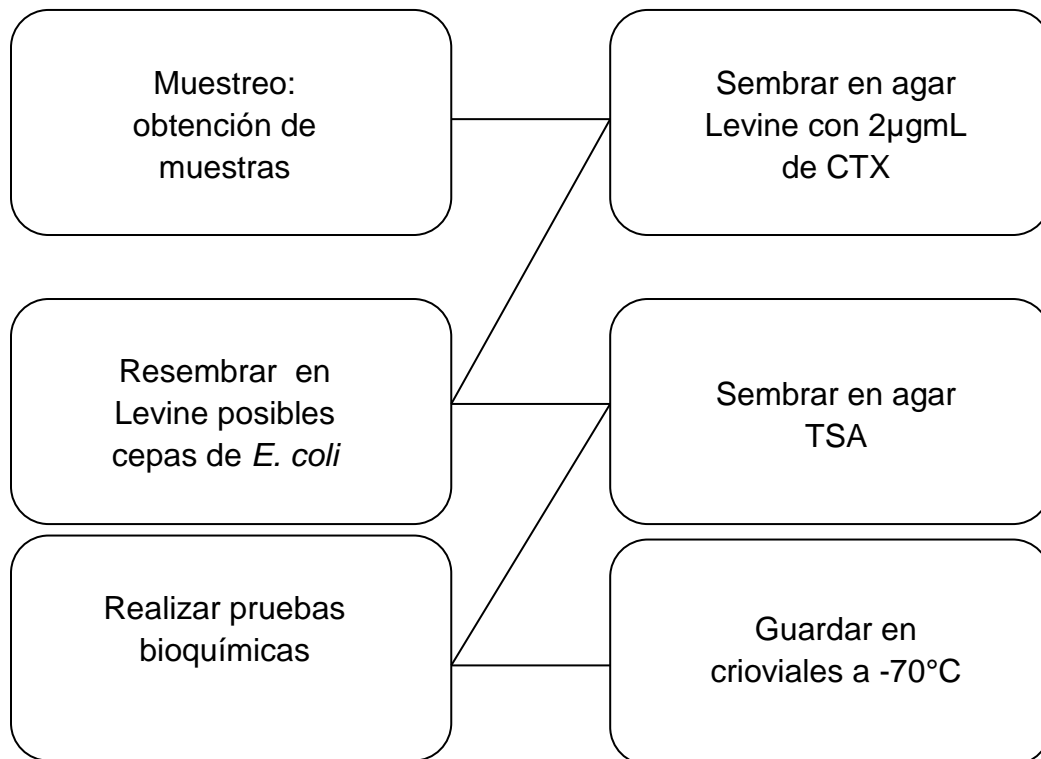
**Figura 13: *Escherichia coli* en Agar Levine ([www.cram.com](http://www.cram.com))**

**Tabla 3:** Identificación bioquímica de *Escherichia coli*

Prueba bioquímica	Diagnóstico
Rojo de metilo	+
Voges-Proskauer	-
Movilidad a 37° C	+
Producción de Indol	+
Ornitina descarboxilasa	+/-
Citrato de Simmons	-
Hidrolisis de la urea	-
Fenilalanina dasaminasa	-
Lisina decarboxilasa	+
Fermentación de lactosa	+

Tomada de (Rodríguez, 2002)

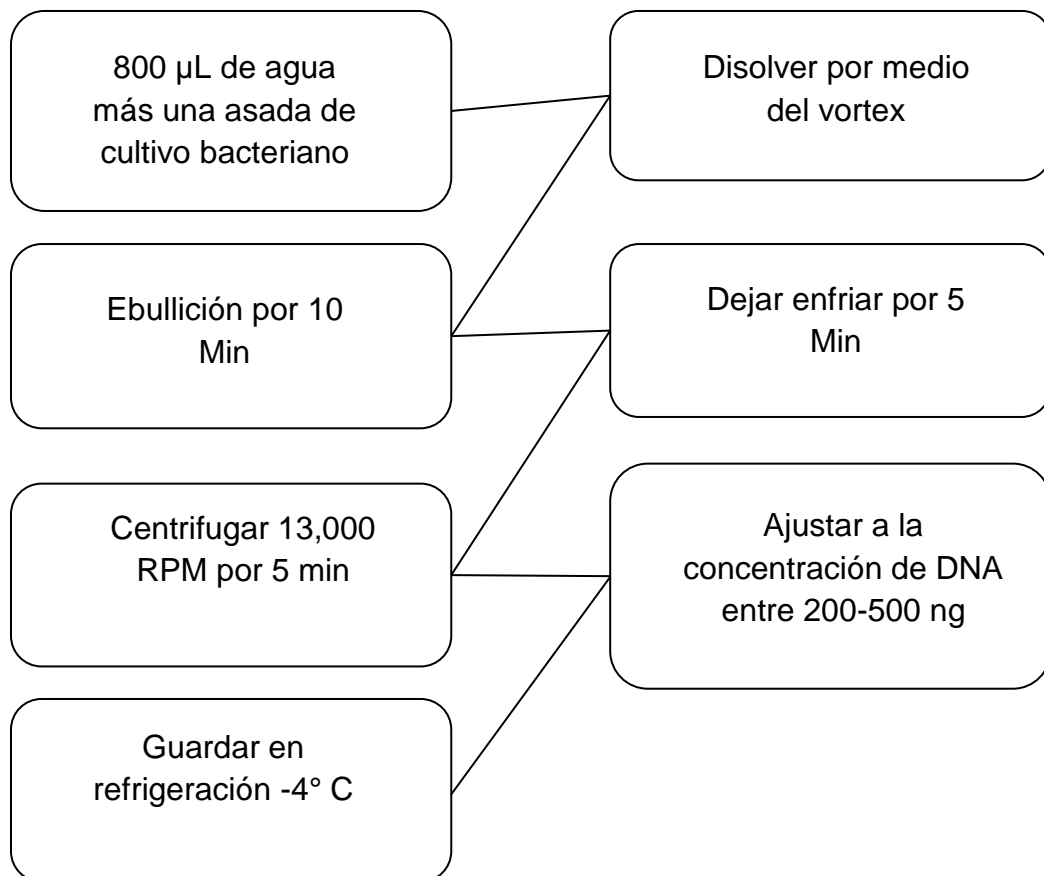
**Diagrama 2:** Aislamiento e identificación de *E. coli*



### 9.7 Lisis celular, extracción de templado de DNA bacteriano.

Para obtener el templado de DNA bacteriano se realizó por la técnica de choque térmico (Pitout *et al.*, 1998), en el cual se colocaron, 800  $\mu$ L de agua inyectable destilada en tubos eppendorf y partiendo de un cultivo bacteriano de 24 h a 37° C sembrado en agar TSA, se colocó una asada y se disolvió con la ayuda del vortex, posteriormente se llevó a ebullición en baño María durante 10 min, se dejó enfriar durante 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 13,000 RPM por 5 min, se obtuvo el sobrenadante y se midió la concentración de DNA en ng/mL en el Nanodrop®, la cual estuvo a una concentración entre 200-500 ng/mL. Una vez obtenido el templado DNA bacteriano se guardó en congelación a -20° C para su posterior uso en las pruebas de PCR (**Diagrama 3**).

**Diagrama 3:** Lisis celular



## 9.8 PCR del gen *uidA* para confirmación de especie (*E. coli*)

Una vez obtenidos los lisados bacterianos se realizó la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) para confirmar si las cepas de *E. coli* que se aislaron, presentan el gen *uidA* debido ya que el 94-96% de cepas *E. coli* presentan este gen que codifica para la enzima  $\beta$ -D-glucoronidasa (GUD), esta técnica se llevó a cabo en un termociclador (Biometra ®), usando de cepa control a *E. coli* C7200.

Los oligonucleótidos que se utilizaron para la amplificación del gen *uidA* se encontraban a una concentración de 25  $\mu$ M (Tabla 4).

**Tabla 4:** Oligonucleótidos utilizados para la identificación del gen *uidA*

Gen	Primer	Secuencia (5´-3´)	Tamaño (pb)
uidA	<i>uidA</i> -F	GCGACATGCGTCACCACGGTGAT	486
	<i>uidA</i> -R	CACCACGATGCCATGTTCATCTGC	

Se realizó una mezcla de agua, buffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTP´s, oligonucleótidos, taq y DNA lisado, en una concentración como lo muestra la (Tabla 5).

**Tabla 5:** Mezcla de reacción para PCR

Compuesto	Concentración inicial (Stock)	Cantidad adicionada	Concentración Final
H2O libre de nucleasas	-	6.4	Ajustar volumen final
Buffer	10 X	1 $\mu$ L	1 X
MgCl <sub>2</sub>	25 Mm	1 $\mu$ L	1-4 mM
dNTP´s	10 mM	0.4 $\mu$ L	0.2 mM (mezcla)
Oligo F	25 Mm	0.3 $\mu$ L	0.1-1 $\mu$ M
Oligo R	25 Mm	0.3 $\mu$ L	0.1-1 $\mu$ M



Taq pol	5 U/μL	0.1 μL	0.0250 U/μl
DNA lisado	200-500 ng/mL	0.5 μL	10 pg-1 μg
Volumen final	-	10 μl	10 μl

Las condiciones para realizar la PCR están señaladas en la **Tabla 6**.

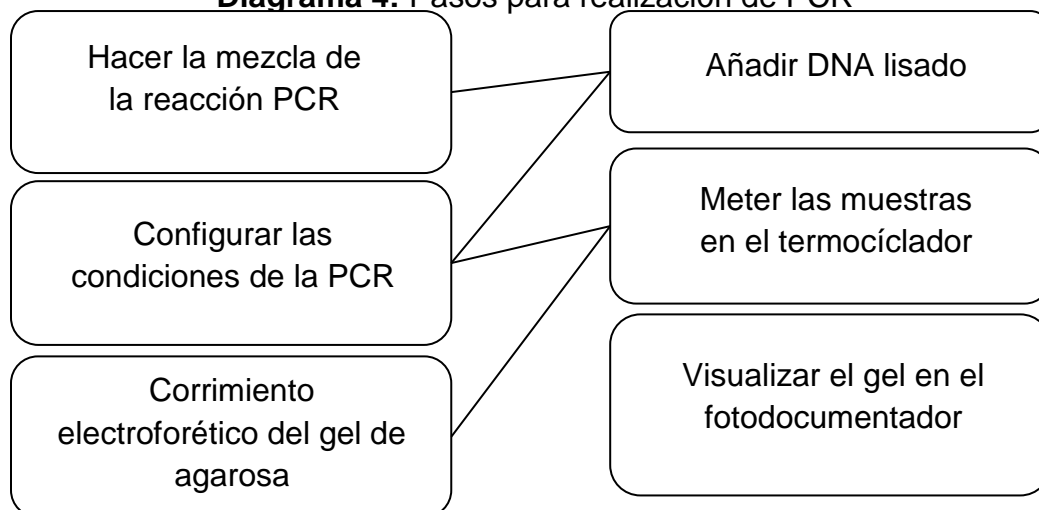
**Tabla 6:** Condiciones de la reacción de PCR para el gen *uidA*.

Gen a amplificar	Oligonucleótidos	Desnaturalización inicial	Ciclos	Segmentos	Extensión final	Conservación final
<i>uidA</i>	<i>uidA-F</i> <i>uidA-R</i>	95°	30	D=95° A=54° E=72°	72°	10° C

\*Nota: D, desnaturalización; A, Alineamiento; E, extensión

Para visualizar los productos de la PCR se realizaron geles de agarosa (1.5%) para someterlos a corrimiento electroforético en una cámara de electroforesis (BioRad®) con TAE al 1X, a un voltaje de 100 V durante una hora y media, se ocupó un colorante a base de azul de Bromofenol que se mezcló con la muestra; el gel se tiñó con bromuro de etidio (BET 10 mg/mL) durante 15 seg y se lavó con agua destilada durante 10 min, se utilizó un fotodocumentador de luz UV para visualizar los fragmentos de DNA y digitalizar la imagen (**Diagrama 4**)

**Diagrama 4:** Pasos para realización de PCR



## 9.9 Fenotipo de resistencia a antimicrobianos

Después de identificar las cepas de *E. coli*, se procedió a realizar el fenotipo de resistencia a antibióticos. Para esta prueba fue necesario un cultivo de 24 h de las cepas de *E. coli* por lo que se descongelaron y se sembraron en agar TSA incubándolas a una temperatura de 37° C; posteriormente se realizó el perfil de resistencia a antimicrobianos por el método de Kirby-Baüer: se tomó una asada de las cepas *E. coli* aisladas en agar TSA y se ajustó a una concentración de 0.5 grados en la escala de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL) en SSI (NaCl 0.9%) y se sembró en agar Müller-Hinton (Bioxon®) con un hisopo de madera estéril impregnado con la SSI de cada cepa, se sembró en forma de césped masivo. Posteriormente, se colocaron los sensidiscos de los antibióticos (**Figura 14**) (BD BBL®) con la concentración de antibiótico establecida por el CLSI (Clinical Laboratory and Standars Institute, 2015) incubándolo a 37°C, al paso de 24 h se midieron los halos de inhibición y se compararon con los diámetros de referencia dados por el CLSI 2015. En la (**Tabla 7**) se observan los antibióticos que se utilizaron al igual que la concentración y los criterios de evaluación de resultados (**Diagrama 5**).

**Tabla 7:** Antibióticos a utilizar para Enterobacterias

Antibiótico	Familia	(µg)	R	SDD	I	S
Ampicilina (AM)	Penicilina de espectro moderado	10	≥17		14-16	≤13
Cefoxitina (FOX)	Cefalosporina de cuarta generación	30	≥18		15-17	≤14
Imipenem (IPM)	Cabapenem	10	≥23		20-22	≤19
Meropenem (MEM)	Carbapenem	10	≥23		20-22	≤19
Amikacina (AN)	Aminoglucósido	30	≥17		15-16	≤14
Gentamicina (GM)	Aminoglucósido	10	≥15		13-14	≤12
Tobramicina (NN)	Aminoglucósido	10	≥15		13-14	≤12
Estreptomycin (S)	Aminoglucósido	10	≥15		12-14	≤11
Cloranfenicol (C)	Fenicol	30	≥18		13-17	≤12

Trimetoprim-sulfametoxazol (STX)	Sulfonamida/diamnopyrimidina	1.25/ 23.75	≥16		11-15	≤10
Ácido Nalidíxico (NA)	Quinolona	30	≥19		14-18	≤13
Ciprofloxacino (CIP)	Fluoroquinolona	5	≥21		16-20	≤15
Tetraciclina (TE)	Tetraclina	30	≥15		12-14	≤11
Ceftriaxona (CRO)	Cefalosporina		≥23		20-22	≤19

Tomado de CLSI, 2015

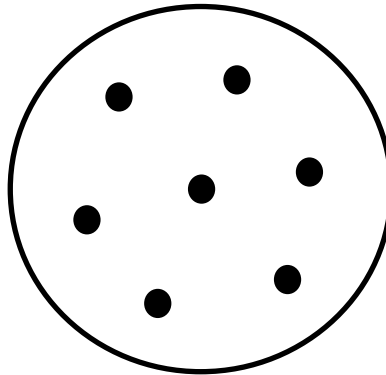
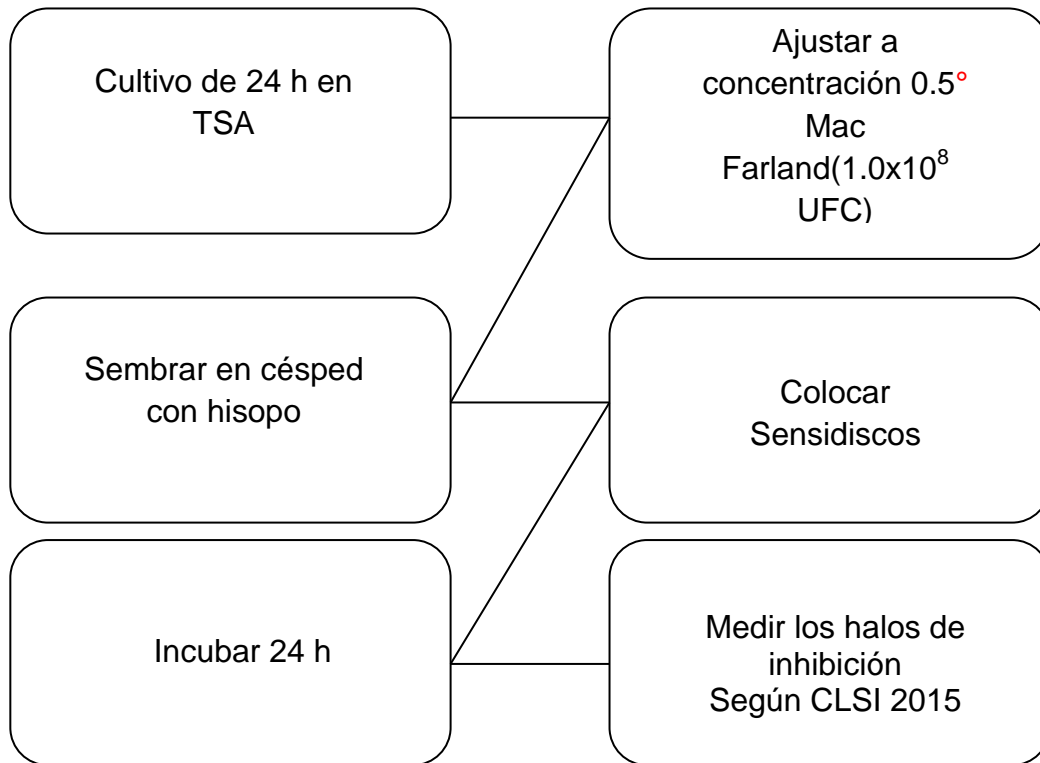


Figura 14. Esquema de colocación de sensibiliscos en la placa de agar Muller-Hinton

Diagrama 5: Fenotipo de resistencia a antimicrobianos



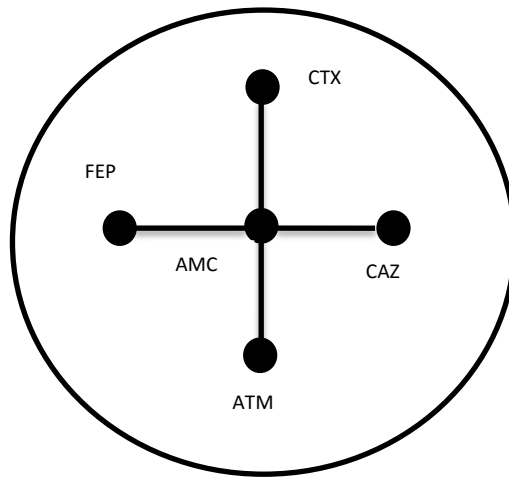
### 9.10 Método de difusión con doble disco para fenotipo BLEE

Esta prueba se realizó paralelamente al perfil de resistencia a antibióticos. Aquí se evaluó la producción de BLEE en las cepas de *E. coli* anteriormente aisladas, se utilizaron cultivos de 24 h de las cepas, se realizó por medio del método de difusión con doble disco el cual consiste en poner en el centro de la placa un sensidisco de AmC (amoxicilina con ácido clavulánico), y alrededor cefalosporinas de diferente generación (cefotaxima: tercera generación, ceftazidima: tercera generación, cefepime: cuarta generación, aztreonam: monobactam), a una distancia de 2 cm desde el término de un disco e inicio de otro (extremo-extremo) (**Figura 15**). Las placas se incubaron durante 24 h a 37° C. Los resultados se compararon con los datos ya establecidos por el CLSI, así como la presencia o ausencia de sinergismo (**Tabla 8**) (**Diagrama 6**).

**Tabla 8:** Lista de antibióticos utilizados para el fenotipo de producción de BLEE

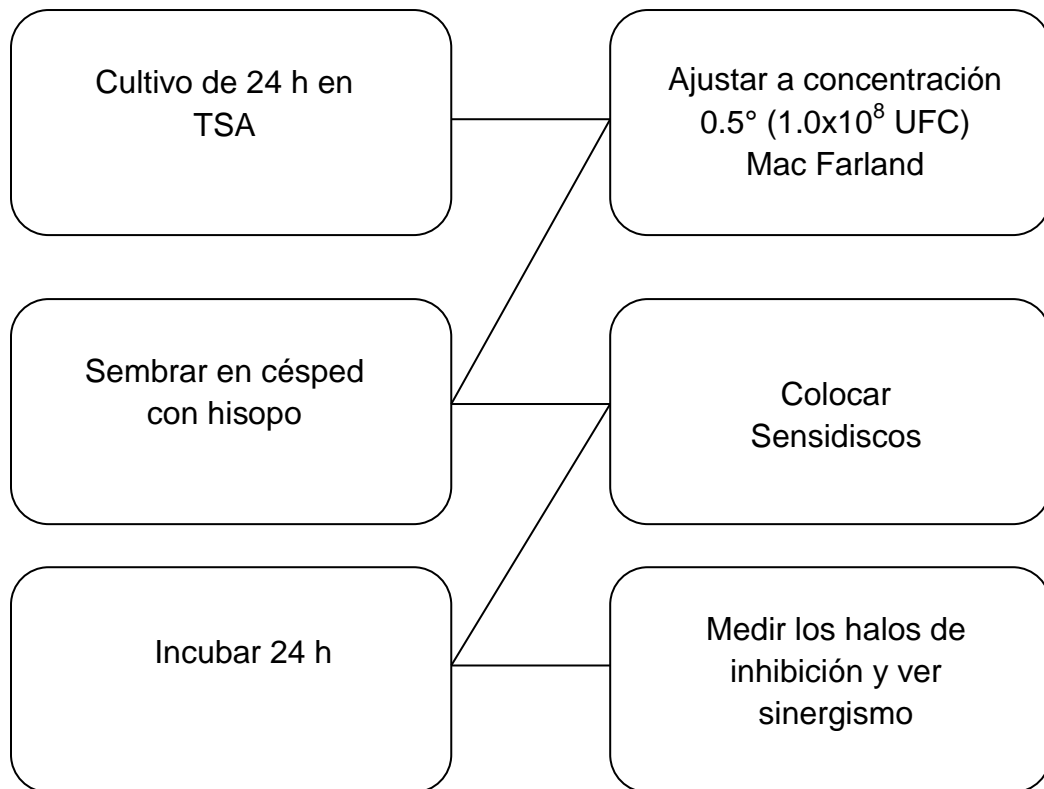
Antibiótico	(µg)	S	SDD	I	R
AmC	20/10	≥18		14-17	≤13
CTX	30	≥26		23-25	≤22
CAZ	30	≥21		18-20	≤17
FEP	30	≥25	19-24		≤18
ATM	30	≥21		18-20	≤17

Tomada de CLSI, 2015



**Figura 15: Esquema de colocación de sensidiscos en la placa de Muller-Hinton, fenotipo de producción BLEE (En el centro AmC, los demás antibióticos pueden ser colocados de forma aleatoria alrededor con una separación de 2 cm)**

**Diagrama 6: Método de difusión con doble disco.**



## **9.11 Electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE)**

Se seguirá el protocolo propuesto por Guatam *et al.*, 1997 brevemente modificado.

### **9.11.1 Preparación de insertos**

A partir de un cultivo puro de 24 h en placa de agar BHI, se realizó una suspensión en 500  $\mu$ L de buffer SE (75 mM NaCl; 25 mM EDTA, pH 8) hasta conseguir una absorbancia de 1.35 a 610 nm.

Se preparó agarosa de bajo punto de fusión (SeaPlaque® agarosa, BMA) al 1.5% en buffer TE y se mantuvo a 54° C, se mezclaron 500  $\mu$ L de la suspensión bacteriana con 500  $\mu$ L de agarosa y se repartió en moldes y se dejaron solidificar 5 min a temperatura ambiente y 10 min en refrigeración.

### **9.11.2 Lisis bacteriana**

Se añadió 1 mL del buffer de lisis (5 mM Tris, 50 mM EDTA, 1% de Sarcosil; 0.1 mg/mL proteinasa K, pH 8) a cada inserto y se dejó incubar 24 h en baño a 54°C.

### **9.10.3 Lavados de los insertos**

Tras eliminar el buffer de lisis, se realizaron los siguientes lavados en el baño de 54° C.

- 1 mL de agua estéril cada 10 min 3 veces
- 1 mL TE cada 10 min 2 veces
- 1 mL TE a temperatura ambiente.

Los insertos se dejaron guardados a 4°C para futuras aplicaciones.

#### **9.11.4 Digestión enzimática**

Se digirió un inserto de cada cepa de estudio con la enzima *XbaI* (5'...T,CTAGA...3', 3'...AGATC,T...5). El volumen final del buffer de digestión fue 100 µL por tubo a lo que se añadió 40 U de enzima *XbaI* (New England, Biolabs) el volumen necesario de buffer 10X de enzima y agua destilada estéril, se dejó incubar durante 6 h a 37° C.

#### **9.11.5 Preparación del gel de agarosa**

Se preparó un gel de agarosa al 1.2 % disuelta en TBE 5x, se vertió la agarosa en el molde para hacer el gel preparado previamente con el peine correspondiente y se dejó solidificar a temperatura ambiente, se rellenaron los pocillos con los insertos y se sellaron con agarosa a 54°C.

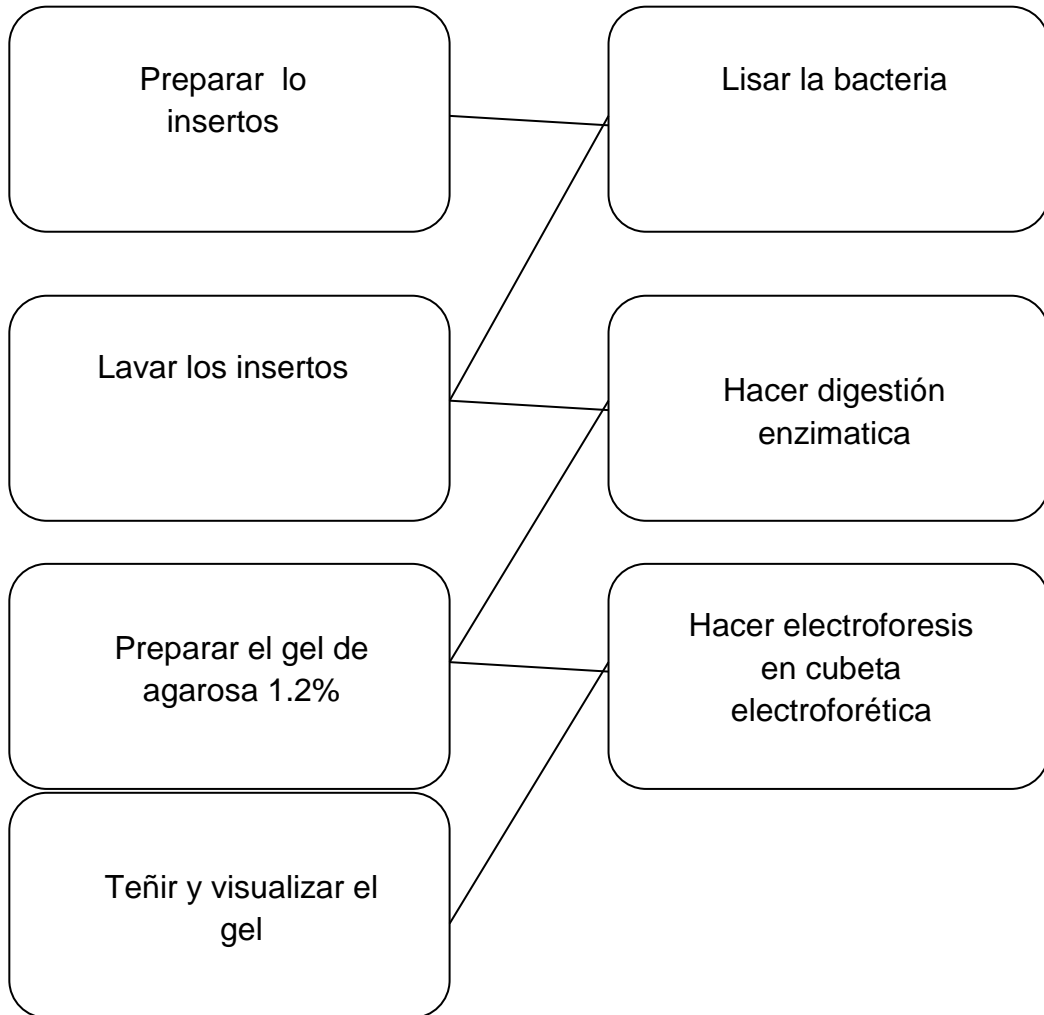
#### **9.11.6 Electroforesis**

Se realizó en una cámara de electroforesis de campos pulsados Chef-DRII (Biorad) con 2 L de TBE 0.5X suplementado con tiourea 75 µM en gradiente de voltaje de 6 V/cm y se empleó una rampa lineal pulsada de 1 a 30 seg durante 23 h a 14° C manteniendo la velocidad de la bomba de refrigeración a 70.

#### **8.10.7 Tinción del gel y Visualización**

Se tiñó en una solución de 200 mL de bromuro de etidio (10µL/200 mL) durante 10 min, se visualizó el gel en un luminador UV y se tomó una fotografía con el fotodocumentador de UV. El gel se destiñó en agua y se digitalizó (**Diagrama 7**).

**Diagrama 7:** Electroforesis en gel de campos pulsados





## 10. RESULTADOS

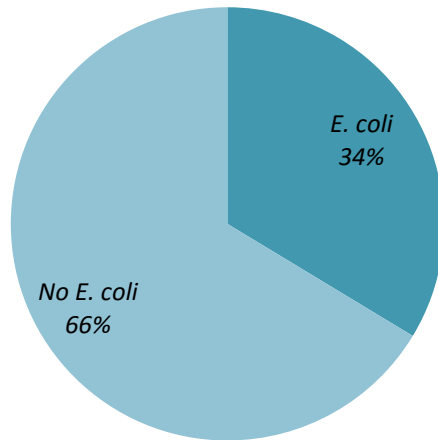
### 10.1 Aislamiento e identificación de cepas de *Escherichia coli*

Se recolectaron un total de 104 muestras en la zona urbana de la ciudad de Puebla, durante el periodo de Enero-Junio del 2015; 52 provinieron de perros y 52 de sus dueños. Las muestras se sembraron en agar Levine adicionado con CTX (2 µg/mL) y se seleccionaron aquellas con una morfología de probable *E. coli* esto es, que presentaran un brillo verde metálico (**Figura 16**).

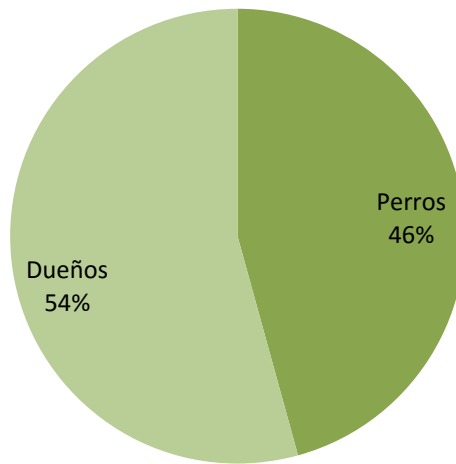


**Figura 16: Crecimiento de *E. coli* en medio Levine con CTX (2 µg/mL)**

Tras este criterio se obtuvieron un total de 35 cepas (33.65%) como probables *E. coli* (**Grafica 1**), de las cuales 19 fueron aisladas de dueños (54%) y 16 cepas aisladas de perros (46%) (**Grafica 2**). Solo en 7 casos las cepas concordaron con el crecimiento tanto de perros como en sus dueños. A las cepas aisladas se les realizaron las pruebas bioquímicas estándar para su identificación, como resultado se obtuvo que 34 cepas dieron las características fenotípicas de *E. coli* en las pruebas bioquímicas y 1 cepa se identificó como *Klebsiella oxytoca* (**Tabla 9**).



**Grafica 1. Porcentaje de cepas de *E. coli* aisladas de muestras fecales de perros y sus dueños.**



**Grafica 2. Porcentajes de cepas de perro y dueños aisladas de muestras fecales**

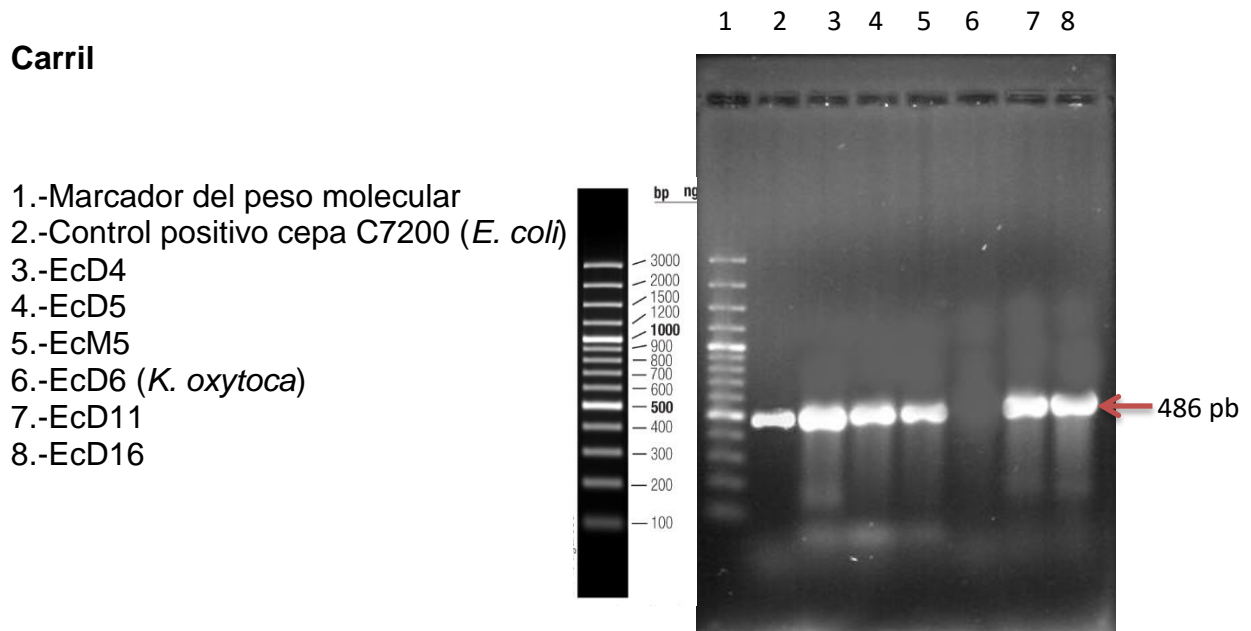
**Tabla 9:** Resultado de las pruebas bioquímicas de las 35 cepas de *E. coli*.

Cepa	TSI			LIA		M	I	O	CIT	UREA	Phe	VP	RM	Microorganismo aislado
	TSI	G	SH	LIA	SH									
EcD4	A/A	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
EcD5	A/A	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
EcM5	A/A	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
EcD6	A/A	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>
EcD11	A/A	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
EcD16	A/A	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
EcD17	A/A	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
EcD18	A/A	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
EcD21	A/A	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
EcD22	A/A	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
EcD23	A/A	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
EcM23	A/A	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
EcD26	A/A	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
EcM26	A/A	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
EcD28	A/A	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
EcM28	A/A	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
EcD29	A/A	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
EcM29	A/A	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
EcD30	A/A	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
EcD31	A/A	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
EcM31	A/A	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
EcM32	A/A	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
EcD33	A/A	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
EcM33	A/A	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
EcM34	A/A	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
EcM35	A/A	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
EcM36	A/A	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
EcD38	A/A	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
EcD39	A/A	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
EcM44	A/A	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
EcM45	A/A	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
EcM46	A/A	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
EcM47	A/A	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
EcM48	A/A	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
EcM52	A/A	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>

\*Nota: La muestra en azul EcD6 fue identificada como *Klebsiella oxytoca*.

Adicionalmente a las 35 cepas, se les realizó la búsqueda del gen especie específico *uidA* que codifica para la  $\beta$ -D-glucuronidasa (GUD) de *E. coli*, con un peso de 486 pb. Cabe mencionar que aunque la cepa EcD6 ya había sido

identificada como *K. oxytoca*, se incluyó en esta PCR como control negativo. De estas cepas 34 presentaron el gen *uidA*, a continuación se observan las fotos de las electroforesis en geles de agarosa al 1.5%.



Positivas: C7200 (control positivo), EcD4, EcD5, EcM5, EcD11, EcD16  
 Negativa (*K. oxytoca*): EcD6

**Figura 17: Corrimiento electroforético del Gen *uidA***

## 10.2 Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana

A las 35 cepas se le realizó la prueba de susceptibilidad a los 19 antimicrobianos anteriormente mencionados y el halo de inhibición se comparó con los valores establecidos por el CLSI versión 2015. En la siguiente tabla se observan los resultados de la prueba (**Tabla 10**).

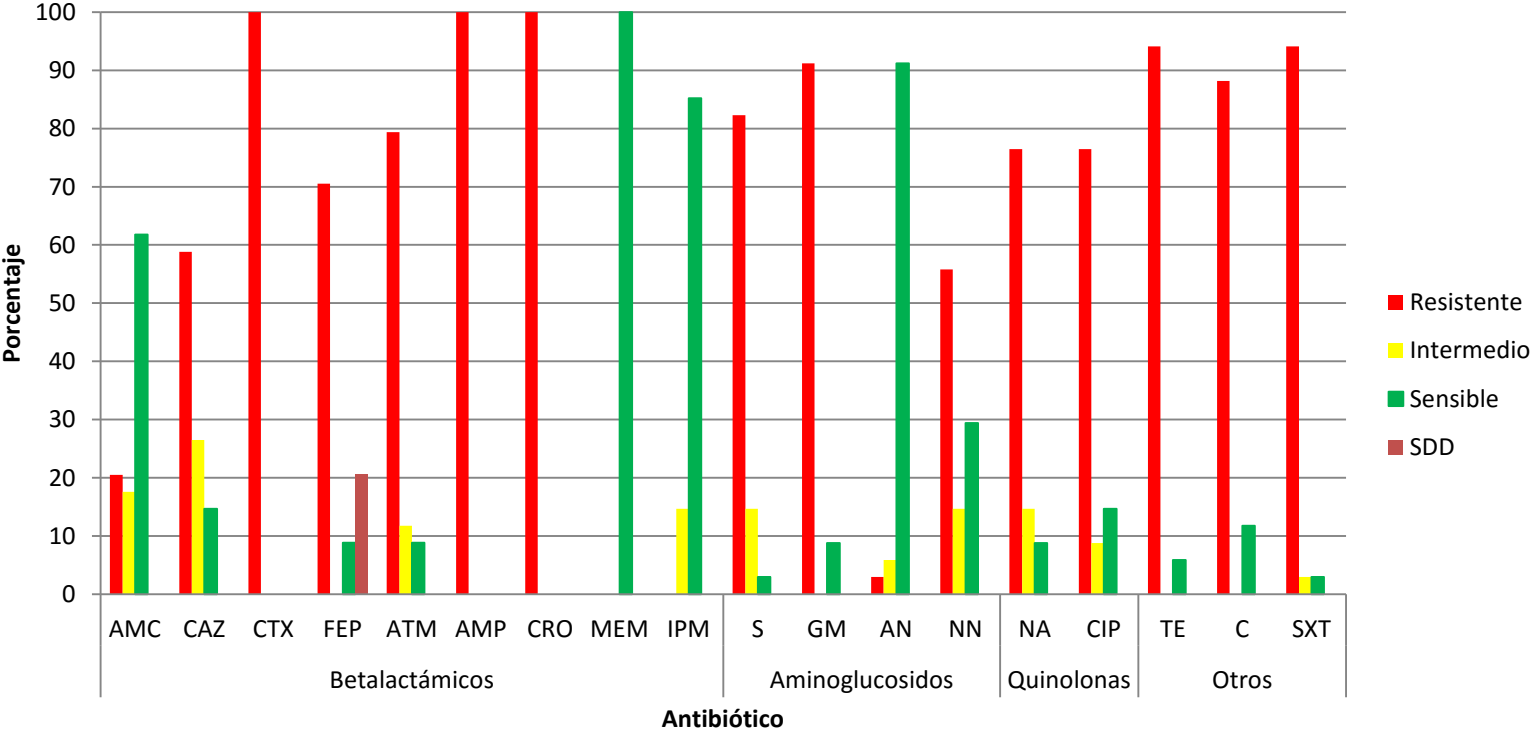
**Tabla 10:** Perfil de resistencia a antibióticos de las cepas de *E. coli*.

Cepa	Bacteria	Fenotipo de resistencia																		
		Betalactámicos										Aminoglucósidos				Quinolonas		Otros		
		AMC	CAZ	CTX	FEP	ATM	FOX	AMP	CRO	MEM	IPM	S	GM	AN	NN	NA	CIP	TE	C	SXT
EcD4	<i>E. coli</i>	S	I	R	R	R	S	R	R	S	S	I	R	S	S	I	R	R	R	
EcD5	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	I	R	R	S	S	I	R	R	R	R	R	R	R	
EcM5	<i>E. coli</i>	S	I	R	SDD	I	S	R	R	S	S	R	R	S	S	S	I	R	R	
EcD6	<i>K. oxytoca</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
EcD11	<i>E. coli</i>	R	I	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S	I	R	R	R	R	
EcD16	<i>E. coli</i>	S	I	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	
EcD17	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	I	I	R	S	
EcD18	<i>E. coli</i>	S	I	R	SDD	R	S	R	R	S	S	R	R	I	R	I	S	R	R	
EcD21	<i>E. coli</i>	S	I	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	
EcD22	<i>E. coli</i>	R	S	R	SDD	I	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	
EcD23	<i>E. coli</i>	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	
EcM23	<i>E. coli</i>	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	
EcD26	<i>E. coli</i>	I	I	R	SDD	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	
EcM26	<i>E. coli</i>	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	I	R	S	R	R	R	S	R	
EcD28	<i>E. coli</i>	I	R	R	SDD	I	S	R	R	S	S	R	R	S	I	I	S	R	R	
EcM28	<i>E. coli</i>	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	
EcD29	<i>E. coli</i>	S	I	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S	I	R	R	R	R	
EcM29	<i>E. coli</i>	R	I	R	R	R	S	R	R	S	S	I	R	S	R	R	R	R	S	
EcD30	<i>E. coli</i>	I	R	R	R	R	I	R	R	S	S	R	R	S	I	R	R	R	I	
EcD31	<i>E. coli</i>	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S	R	I	S	R	R	
EcM31	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	
EcM32	<i>E. coli</i>	I	R	R	R	R	I	R	R	S	S	R	R	S	S	R	I	R	R	
EcD33	<i>E. coli</i>	I	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S	I	R	R	R	R	
EcM33	<i>E. coli</i>	I	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	
EcM34	<i>E. coli</i>	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	
EcM35	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	I	R	R	R	R	R	
EcM36	<i>E. coli</i>	S	R	R	SDD	R	S	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	
EcD38	<i>E. coli</i>	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	
EcD39	<i>E. coli</i>	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	
EcM44	<i>E. coli</i>	S	R	R	R	R	S	R	R	S	I	R	R	S	R	R	R	R	R	
EcM45	<i>E. coli</i>	S	R	R	R	R	S	R	R	S	I	R	R	S	R	R	R	R	R	
EcM46	<i>E. coli</i>	S	R	R	R	R	S	R	R	S	I	R	R	S	R	R	R	R	R	
EcM47	<i>E. coli</i>	S	R	R	R	R	S	R	R	S	I	R	R	S	R	R	R	R	R	
EcM48	<i>E. coli</i>	S	R	R	R	R	S	R	R	S	I	R	R	S	R	R	R	R	R	
EcM52	<i>E. coli</i>	S	S	R	SDD	I	S	R	R	S	S	I	R	S	S	I	S	R	S	

\*Nota: S, Sensible; I, Intermedio; R, Resistente; SDD, Sensible dependiendo de la dosis

En cuanto a la resistencia individual por antibiótico se obtuvo que un 20.5% fue resistente a amoxicilina con ácido clavulánico (AMC); 58.82% resistente a ceftazidima (CAZ); 100% de las cepas presentaron resistencia a cefotaxima (CTX); 70.5 % fue resistente a cefepime (FEP); 79.4% de las cepas tuvieron resistencia a aztreonam (ATM); 2.94% fue resistentes a cefoxitina (FOX); 100% de las cepas dieron resistencia a ampicilina (AMP) y ceftriaxona (CRO), ninguna de las cepas presentó resistencia a meropenem (MEM); el 14.7% fue intermedio a imipenem (IPM); 82.3% de resistencia a estreptomicina (S), 91.2% fue resistente gentamicina (GM); 2.94 % fueron resistentes a amikacina (AN); 55.8% de las cepas presentaron resistencia a trobramicina (NN); el 79.47% de las cepas tuvo resistencia a ácido nalidixico (NA); 76.47% de resistencia a ciprofloxacino (CIP); 94.117% de las cepas presentaron resistencia tetraciclina (TE); 88.2% de las cepas fueron resistentes a cloranfenicol (C) y el 94.117% de las cepas presentaron resistencia a trimetoprim con sulfametoxazol (SXT). (**Grafica 3**)

### Perfil de susceptibilidad a antimicrobianos



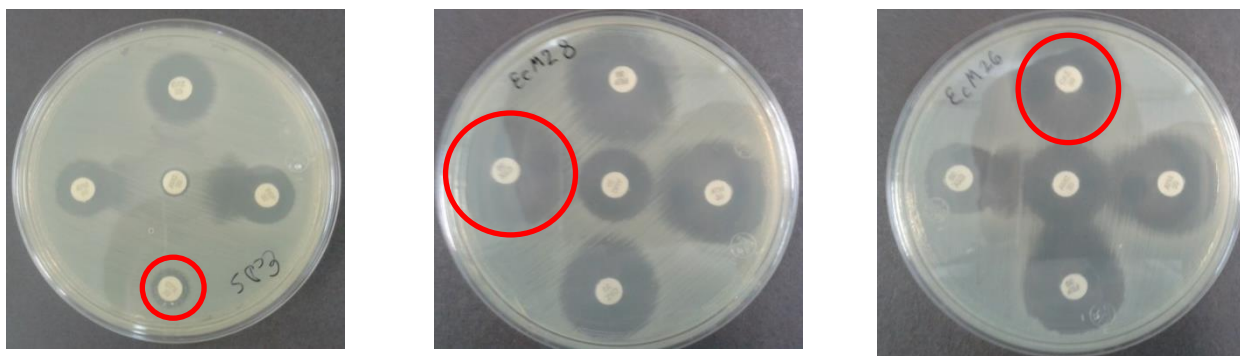
clavulanico (AMC), ceftazidima(CAZ), cefotaxima (CTX), cefepime (FEP), aztreonam (ATM), ampicilina (AMP), ceftriaxona (CRO), meropenem (MEM),

imipenem (IPM), estreptomicina (S), gentamicina (GM), amikacina (AN), tobramicina (NN), ácido nalidixico (NA), ciprofloxacino (CIP), tetraciclina (TE), cloranfenicol (C), trimetoprim con sulfametoxazol (SXT).

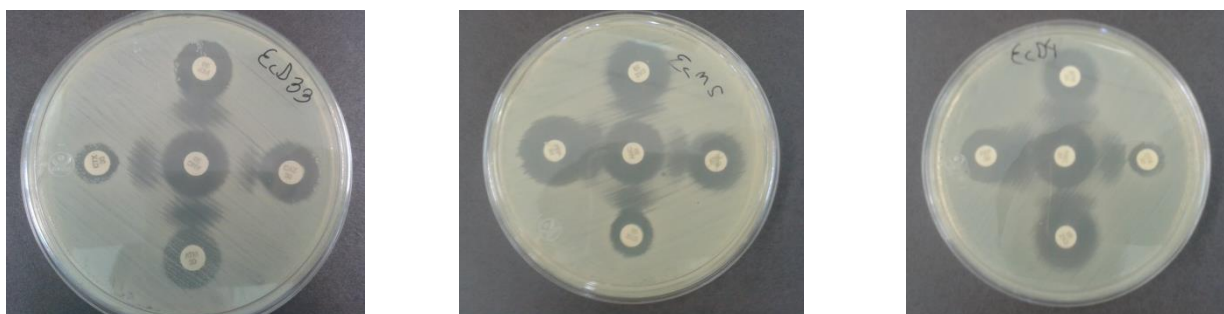
### 10.3 Fenotipo de $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE)

A la par de la determinación de la susceptibilidad a antimicrobianos se determinó la producción fenotípica de BLEE en todas las cepas anteriormente identificadas como *E. coli*. Se obtuvo que la mayoría de las cepas presentó sinergismo hacia los 4  $\beta$ -lactámicos evaluados (**Figura 19**), a excepción de las cepas EcD5 (**Figura 18**) en la que no se observó el sinergismo con CTX y las cepa EcM26 y EcM28 (**Figura 19a y b**) que no presentaron sinergismo con CAZ (**Tabla 11**).

En las siguientes imágenes se observa el sinergismo que denota producción de BLEE en algunas cepas de *E. coli*.



**Figura 18:** Cepas de *E. coli* EcD5 (18a), EcM26 (18b) y EcM28 (18c) en el círculo rojo se observa el antibiótico que no mostró sinergismo.



**Figura 19:** Cepas de *E. coli* EcD33 (19a), EcM5 (19b) y EcD5 (19c) con fenotipo BLEE positivo.

**Tabla 11:** Fenotipo BLEE de las 34 cepas de *E. coli*.

Cepa	Bacteria	Fenotipo BLEE								
		Betalactamicos								
		AMC	CAZ	BLEE	CTX	BLEE	FEP	BLEE	ATM	BLEE
EcD4	<i>E. coli</i>	S	I	+	R	+	R	+	R	+
EcD5	<i>E. coli</i>	R	R	+	R	-	R	+	R	+
EcM5	<i>E. coli</i>	S	I	+	R	+	SDD	+	I	+
EcD6	<i>K. oxytoca</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EcD11	<i>E. coli</i>	R	I	+	R	+	R	+	R	+
EcD16	<i>E. coli</i>	S	I	+	R	+	R	+	R	+
EcD17	<i>E. coli</i>	R	R	+	R	+	R	+	R	+
EcD18	<i>E. coli</i>	S	I	+	R	+	SDD	+	R	+
EcD21	<i>E. coli</i>	S	I	+	R	+	R	+	R	+
EcD22	<i>E. coli</i>	R	S	+	R	+	SDD	+	I	+
EcD23	<i>E. coli</i>	S	R	+	R	+	R	+	R	+
EcM23	<i>E. coli</i>	S	S	+	R	+	S	+	S	+
EcD26	<i>E. coli</i>	I	I	+	R	+	SDD	+	R	+
EcM26	<i>E. coli</i>	S	S	-	R	+	S	+	S	+
EcD28	<i>E. coli</i>	I	R	+	R	+	SDD	+	I	+
EcM28	<i>E. coli</i>	S	S	-	S	+	S	+	S	+
EcD29	<i>E. coli</i>	S	I	+	R	+	R	+	R	+
EcM29	<i>E. coli</i>	R	I	+	R	+	R	+	R	+
EcD30	<i>E. coli</i>	I	R	+	R	+	R	+	R	+
EcD31	<i>E. coli</i>	S	R	+	R	+	R	+	R	+
EcM31	<i>E. coli</i>	R	R	-	R	+	R	+	R	+
EcM32	<i>E. coli</i>	I	R	+	R	+	R	+	R	+
EcD33	<i>E. coli</i>	I	R	+	R	+	R	+	R	+
EcM33	<i>E. coli</i>	I	R	+	R	+	R	+	R	+
EcM34	<i>E. coli</i>	S	R	+	R	+	R	+	R	+
EcM35	<i>E. coli</i>	R	R	+	R	+	R	+	R	+
EcM36	<i>E. coli</i>	S	R	+	R	+	SDD	+	R	+
EcD38	<i>E. coli</i>	S	R	+	R	+	R	+	R	+
EcD39	<i>E. coli</i>	S	R	+	R	+	R	+	R	+
EcM44	<i>E. coli</i>	S	R	+	R	+	R	+	R	+
EcM45	<i>E. coli</i>	S	R	+	R	+	R	+	R	+
EcM46	<i>E. coli</i>	S	R	+	R	+	R	+	R	+
EcM47	<i>E. coli</i>	S	R	+	R	+	R	+	R	+
EcM48	<i>E. coli</i>	S	R	+	R	+	R	+	R	+
EcM52	<i>E. coli</i>	S	S	+	R	+	SDD	+	I	+



#### 10.4 Electroforesis en gel de campos pulsados

De las 34 cepas se encontraron 7 casos en los que hubo crecimiento en Levine con CTX tanto en la muestra proveniente del dueño como de la mascota, a estas cepas se les determinó el patrón de digestión genómica mediante la técnica PFGE, que permitió determinar la relación clonal de las mismas. Se seleccionaron 10 cepas que presentaban fenotipo de resistencia similar además de 5 cepas de mascotas que viven en el mismo hogar y que presentaron el mismo perfil de resistencia (Tabla 12).

**Tabla 12:** Cepas de dueño y mascota a las que se les realizó PFGE.

Cepa	Bacteria	Fenotipo de resistencia																		
		Betalactamicos										Aminoglucósidos				Quinolonas		Otros		
		AMC	CAZ	CTX	FEP	ATM	FOX	AMP	CRO	MEM	IPM	S	GM	AN	NN	NA	CIP	TE	C	SXT
EcD5	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	I	R	R	S	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R
EcM5	<i>E. coli</i>	S	I	R	SDD	I	S	R	R	S	S	R	R	S	S	S	I	R	R	R
EcD23	<i>E. coli</i>	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	R
EcM23	<i>E. coli</i>	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R
EcD29	<i>E. coli</i>	S	I	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S	I	R	R	R	R	R
EcM29	<i>E. coli</i>	R	I	R	R	R	S	R	R	S	S	I	R	S	R	R	R	R	S	R
EcD31	<i>E. coli</i>	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S	R	I	S	R	R	R
EcM31	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R
EcD33	<i>E. coli</i>	I	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S	I	R	R	R	R	R
EcM33	<i>E. coli</i>	I	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R
EcM44	<i>E. coli</i>	S	R	R	R	R	S	R	R	S	I	R	R	S	R	R	R	R	R	R
EcM45	<i>E. coli</i>	S	R	R	R	R	S	R	R	S	I	R	R	S	R	R	R	R	R	R
EcM46	<i>E. coli</i>	S	R	R	R	R	S	R	R	S	I	R	R	S	R	R	R	R	R	R
EcM47	<i>E. coli</i>	S	R	R	R	R	S	R	R	S	I	R	R	S	R	R	R	R	R	R
EcM48	<i>E. coli</i>	S	R	R	R	R	S	R	R	S	I	R	R	S	R	R	R	R	R	R

\*Nota: R; resistente, I; intermedio, S; sensible, SDD; sensible dependiendo de la dosis

Las cepas de *E. coli* EcD5 y EcM5 se diferencian en la susceptibilidad de 9 antibióticos, siendo la cepa EcM5 más sensible. Del segundo par de cepas EcD23 y EcM23, se observa que en 7 antibióticos tienen diferencias notorias siendo la EcM23 la más sensible. Del tercer par de cepas EcD29 y EcM29 se observa que en 5 antibióticos hay diferencia, siendo EcM29 la más sensible. En el cuarto grupo de cepas EcD31 y EcM31, se observan 4 diferencia en antibióticos siendo la cepa EcD31 la más sensible. El quinto grupo de cepas EcD33 y EcM33 únicamente se diferencia en 1 antibiótico. Finalmente en las cinco cepas: EcM44,

EcM45, EcM46, EcM47 y EcM48, se observa el mismo perfil de resistencia y cabe destacar que estas cepas provinieron de mascotas que viven en la misma casa (Figura 20).

**Carril**

- 1: EcD5
- 2: EcM5
- 3: EcD23
- 4: EcM23
- 5: EcD29
- 6: EcM29
- 7: EcD31
- 8: EcM31
- 9: EcD33
- 10: EcM33
- 11: EcM44
- 12: EcM45
- 13: EcM46
- 14: EcM47
- 15: EcM48



**Figura 20: PFGE de las cepas de perros y dueños**

## 11. DISCUSIÓN

En la actualidad la resistencia a los antibióticos es cada vez más alta, volviendo a los tratamientos médicos obsoletos e ineficaces, esta problemática ya no sólo se da dentro de los hospitales sino que se ha extendido y reportado en otros nichos ecológicos como el agua, aire, productos provenientes de animales y de manera más importante en animales de compañía.

En este trabajo se ha mencionado que en varios países del mundo se han reportado diversos estudios de cepas de *E. coli* que presentan multirresistencia, aisladas de animales salvajes, para consumo humano y en mascotas. Mientras que en México los estudios son escasos y los que hay se enfocan principalmente en el ambiente clínico.

En este estudio se obtuvieron 34 cepas de *E. coli*, 19 de dueños y 16 de perros; de estas, 7 pares coincidieron con un aislamiento tanto en el dueño como en el perro, esto podría indicar que las cepas de *E. coli* multirresistente podrían diseminarse, debido a las malas medidas de higiene que las personas tienen con sus perros, ya que muchas de ellas permiten que sus perros duerman con ellos, coman del mismo plato y vayan al baño dentro de sus hogares. También se observó que no todos los dueños y mascotas comparten cepas multirresistentes, esto es debido a que las medidas de higiene que tienen con sus mascotas podrían ser las correctas.

De estas 35 cepas, 1 fue identificada como *Klebsiella oxytoca* por los resultados de las pruebas bioquímicas y por medio de la PCR del gen *uidA*, ya que la cepa EcD6 no presentó este gen, mientras que las demás cepas lo presentaron, evidenciando que el 100% de cepas identificadas como *E. coli* tienen presente el gen que codifica para la B-D-glucoronidasa.

Cabe destacar que las muestras fueron tomadas de perros y dueños sanos, por lo que es importante notar la multirresistencia en casi todas las cepas aisladas. De las muestras pertenecientes al grupo de los 7 pares de cepas que se

aislaron tanto de dueño como de perro, no se observó un mismo perfil de resistencia, esto se debe a que es posible que tanto el dueño como la mascota hayan adquirido esta bacteria por diferentes medios, como puede ser: la comida, la interacción con otras mascotas, el uso indiscriminado de antibióticos, etc. Que pueden provocar que se lleve a cabo su diseminación, aunque es importante recalcar que aunque no presenten el mismo fenotipo de resistencia, estas representan un gran riesgo, ya que además de ser multirresistentes pueden llegar a esparcirse a diferentes ambientes e incluso llegar a combinar genes con otras bacterias incluso de diferente género.

La mayoría de las cepas de *E. coli* identificadas presentan el fenotipo BLEE positivo a las 3 cefalosporinas de diferente generación (CTX, CAZ, FEP) y al monobactámico utilizados en el método de difusión con doble disco, a excepción de las cepas EcM26 y EcM28 que no presentaron sinergismo con CAZ, hecho que concuerda con el fenotipo de sensibilidad de estas cepas a ese antibiótico; mientras que la cepa EcM5 tampoco presentó sinergismo con CTX, aunque presenta fenotipo de resistencia a esta cefalosporina, esto podría deberse a que la cepa EcM5 puede adquirir esta resistencia por medio de otro mecanismo no mediado por alguna  $\beta$ -lactamasa.

Para observar la relación clonal de las cepas de *E. coli* que se aislaron de mascotas y dueños, se seleccionaron 5 pares de cepas que presentaron fenotipos de resistencia similar (se diferencian en pocos antibióticos), con esta técnica se pretendió determinar si se trataba de las mismas cepas; además se seleccionó un caso particular de 5 perros que viven en una misma casa y que presentaron cepas con el mismo perfil de resistencia a antibióticos y mismos fenotipos BLEE.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó que las cepas EcD5, EcM5, EcD23, EcM23, EcD29, EcM29, EcD31, EcM31, EcD33 y EcM33 no presentan un patrón de bandeo igual, por lo que se confirma que no se trata de la misma clona bacteriana y que sus hospederos pudieron adquirir las cepas por diferentes vías o circunstancias.

Sin embargo, al observar el bandeo de campos pulsados del caso de los 5 perros (2 padres y 3 cachorros), cepas EcM44, EcM45, EcM46, EcM47 y EcM48 se observó que se trata de la misma bacteria, lo que sugiere una diseminación entre ellos. Por otro lado los dueños de estas mascotas no presentaron cepas de *E. coli* resistentes a CTX, además que las medidas de higiene que tienen hacia sus mascotas es buena (comunicación directa y no mostrada), lo que indica que mientras las familias cuenten con buenas medidas higiénicas, disminuye la posibilidad de que se transfieran cepas de *E. coli* multirresistentes.

## 12. CONCLUSIONES

- ❖ Se logró identificar y caracterizar cepas de *E. coli* multirresistentes y productoras de BLEE en muestras fecales de mascotas y sus dueños en la zona urbana de la Ciudad de Puebla.
- ❖ De las cepas aisladas se observó que la prevalencia de *E. coli* CTX resistente fue mayor en los dueños que en la mascotas.
- ❖ De acuerdo con el patrón de campos pulsados para las cepas de *E. coli* que presentaron concordancia de crecimiento en Levine y apoyándose del fenotipo de resistencia a antibióticos, se concluye que no se trata de la misma cepa, ya que presentan diferencias muy notorias en dichas pruebas.
- ❖ Las 5 cepas de *E. coli* aisladas de la familia de perros, presentaron un patrón de campos pulsados y fenotipo de resistencia igual, por lo que es probable que se trate de la misma cepa.

### 13. PERSPECTIVAS

- Determinar el grupo filogenético (grupos A, B1, B2, C, D, E o F) de las cepas de *E. coli* multirresistentes.
- Determinar el patotipo de las cepas de *E. coli* aisladas.
- Realizar la búsqueda de genes implicados en la resistencia a otros grupos de antibióticos como quinolonas y aminoglucósidos.
- Realizar experimentos de conjugación para poner de manifiesto la transferencia de los genes de resistencia.
- Buscar elementos genéticos móviles involucrados en la resistencia presentada por estas cepas.

## 14. BIBLIOGRAFÍA

- Aguillon, FR. (2014). Orígenes de la domesticación del perro. *Rev Veterinaria y microbiología*, 40, pp.85-90.
- Álvarez, JP. (2014). Efectos positivos en la domesticación de perro, ventajas y desventajas. *Rev veterinaria y microbiología*. 42, pp. 50-60.
- Andraca-Perera, JR. Rodríguez, E & Fundora, A. (2001). Farmacodivulgación: cefalosporinas. *Rev. Cubana Farm*, 35, pp.219-24.
- Barcelona, L. Marín, M. & Stamboullian, D. (2008). Betalactámicos con inhibidores de betalactamasas, amoxicilina-sulbactam. *Medicina (Buenos Aires)*, 68, pp. 158-63.
- Bello, F. (2013). Caracterización molecular de la resistencia a antibióticos betalactámicos mediada por betalactamasas en cepas de *Escherichia coli* aisladas de muestras fecales de perros. Puebla, Mex: BUAP.
- Briñas, L., Moreno, MA., Teshaguer, T., Sáenz, Y., Porrero, MC., Domínguez, L. & Torres, C. (2005). Monitorin an characterization of extende-spectrum lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy and sick animals in Spain in 2003. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49, pp.1262-1264.
- Briñas, L., Moreno, MA., Zarazaga, M., Porrero, C., Sáenz, Y., Domínguez, L., & Torres, C. (2003). Detection of CMY-2. CTX-M-14 and SHV-12, lactamases in *Eschericha coli* faecal-sample isolates from healthy chickens. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47, 2056-2058.
- Briñas, L., Zarazaga, M., Sáenz, Y., Ruiz, F. & Torres, C. (2002). Betalactamases in ampicilin-resistant *Escherichia coli* isolates from food, Human, and healthy animals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46, 3156-3163.
- Cavaliere, F. (2005). Extended-spectrum betalactamase production among ampicillin-resistant *Escherichia coli* strains from chicken in enugu state, Nigeria. *Brazilian journal of microbiology*, 38, pp.681-686.
- Celis, YA., Pulido, IY., Valenzuela, EM., Reguero, MT. & Mantilla, JR. (2009). Ambiente genético del Gen bla CTX-M-12 en aislamientos hospitalarios de *Klebsiella pneumoniae*. *Revista colombiana de biotecnología*, XI, pp.48-58.
- Chah, KF., Oboegbulem, SI., (2007). Extended- Spectrum beta-lactamase Production Among Ampicillin-Resistant *Escherichia coli* Strains From Chicken in Enugu state Nigeria, *Brazilian Journal of Microbiology*, 38,pp.681-686.



- Clinical and Laboratory Standards Institut. (2015) Performance Standards for Antimicrobial Suceptibility Testing. M100-S21. Volumen 3, Número 1 January. Pennsylvania, USA: CLSI.
- Corpet, DE. (1988). Antibiotic resistance from food. *New England Journal of Medicine*, 318, pp.1206-1207.
- Cortés, JA., Urdaneta, AM., Potdevin, G., Cuervo, SI., Bermúdez, D. Molina, CA & Arroyo, P. (2006). Impacto de las betalactamasas de espectro extendido en pacientes con cancer. *Rev colomb cancerol*, 10, pp. 183-196.
- Costa, D., Poeta, P., Sáenz, Y., Vinué, L., Roj, B., Jouni, A., Zarazaga, M., Rodríguez, J., & Torres C. (2006). Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum betalactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. *Journal of antimicrobial chemotherapy* 53, pp 418-35.
- Cué, M. & Morejón, M. (1998). Antibacterianos de acción sistémica. Parte II, otros grupos de antibióticos. *Rev Cubana Med Gen Integr.* 14, pp.362-73.
- Drassar, BS & Hill LMC. (1974). Human intestinal flora. London, UK: Academic Press.
- García, JA., García, E. (1997). Resistencias bacterianas y antibioterapia. Eficacia in vivo, eficacia in vitro, Madrid-Barcelona. Doyma.
- Garza-Ramos, U., Tinoco, P., Silvia-Sanchez, J., Morfin-Otero, R., Rodriguez-Noriega, E., Leon-Garnica, G., Sader, HS & Jones, RN. (2008). Metallo betalactamase IMP-18 is located in a class L integron (In96) in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa* from México. *Int. J. Antimicrob agents* 3: 78-80.
- Girlich, D., Poirel, L., Caratolli, A., Kempf, I., Lartigu, MF., Bertini, A. & Nordmann, P. (2007). Extended-spectrum-lactamase CTZ-M-4. *FEMS Microbiol*, 169, pp.289-293.
- Gobernado, M, (2005). Betalactamasas de espectro extendido en aumento. *Rev esp Quimioterap*, 18, pp. 115-117.
- Gómez, R., Gil, J & Rubio, MC. (1992). Impacto de los inhibidores de betalactamasas en la susceptibilidad antibiótica de los patógenos más frecuentes. En: *Betalactamasas: su importancia para el clínico*. Madrid: SAE.
- Hanahan, D. (1998). Angiogenesis and apoptosis are cellular parameter on neoplastic progression in transgenic mouse model of tumorigenesis. *Int. J. De. Biol*, 42, 995-1002.
- Hart, CA. (1998). La resistencia a los antibióticos. ¿un problema creciente?. Chile: Latinoamericana.

- Hernández Cortez C, Aguilera Arreola MG, Castro Escarpulli G. (2011). Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enf Inf Microbiol*; 31, pp.137-151.
- Hernández, W. Ramos, A., Nordarse, R., Padron, A. & De Armas, E. (2006). Resistencia bacteriana en las bacterias productoras de betalactamasas extendidas (BLEE). *Rev. Cub. Med. Inf Emerg*, 5, pp. 256-264.
- Huber, H., Zweifel, C., Wittenbrink, MM. & Stephan, R. (2013). ESBL-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Switzerland. *Veterinary microbiology*, 162, pp.992-996.
- Iguchi A, Thomson NR, Ogura Y, Saunders D, Ooka T, Henderson IR, Harris D, et al. (2009), Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69. *J Bacteriol.* Jan ;191(1):347-54. doi:10.1128/JB.01238-08
- Ito, H., Arakawa, Y., Oshuka, S., Wacharotayankun, R., Kato, N. & Ohta, M. (1995). Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene bla among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *ant. agents chemother*, 39, pp.824-829.
- Kaper, E., Nataro, JP., MJ & Mobley, HL. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2, pp.123-140.
- Kauffman H, Denamur E, Dobrindt U, Finlay BB, Hengge R, Johannes L, Ron EZ, Tønnum T, Sansonetti PJ, Vicente M. The enemy within us: lessons from the 2011 European *Escherichia coli* O104:H4 outbreak. *EMBO Mol Med.* 2012 Sep;4(9):841-8. doi: 10.1002/emmm.201201662.
- Literak, I., Dolejska, M., Janoszowska, D., Hrusakova, J., Meissner, W., Rzycka, H., Bzoma, S. & Cizek, A. (2010). Antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria, including strains with genes encoding the extended-spectrum beta-lactamase and QnrS, in waterbirds on the Baltic Sea coast of Poland. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, pp.8126-8134.
- Livermore, DM. (2003). Bacterial resistance: origins, epidemiology and impact. *Clin Microbiol Rev*, 36, pp.11-23.
- MacFaddin, JF. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
- Mahoney, DF., Koppel, GA & Turner JR. (1976). Substrate inhibition of beta-lactamases, a method for predicting enzymatic stability of cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.*, 10, pp.470-5.

- Mamza, SA., Egwu, GO. & Mshelia, GD. (2010). Betalactamase *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolates from chicken in Nigeria. *Veterinaria Italiana*, 46, pp.1123-1131.
- Mandell, GL., Petri, WA. (1997). Quimioterapia de las enfermedades microbianas en farmacología veterinaria. McGraw-Hill interamericana, Madrid, España.
- Marín, M & Guidol, F. (2003). Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 21, pp.42-55.
- Matsumoto, Y. & Inoue, M., (1999). Characterization of SFO-1, a plasmid mediated inducible class A beta lactamase from *Enterobacter cloacae*, *antimicrob. Agents chemother*, 43, pp.307-313.
- Medeiros, AA. (1997). Evolution and dissemination of betalactamases accelerated by generations of betalactam antibiotics. *Clin. Infect. Dis*, 24, pp.19-45.
- Mediavilla, A. Azanza, JR., Honorato, J. (2011). Macrólidos, cetólidos, lincosamidas, tetraciclinas, cloranfenicol, otros antibióticos, en: Farmacología humana 5° ed. Masson.
- Mella, S., Acuña, G., Muñoz, M., Pérez, C., Labarca, J., González, G., Bello, H., Dominguez, M. & Zemelman, R. (2000). Quinolonas: aspectos generales sobre su estructura y clasificación. *Rev chil infect*, 17, pp.53-66.
- Mendoza, T., Azanza, JR., Honorato, J. (2011). Macrólidos, cetólidos, lincosamidas, tetraciclinas, cloranfenicol, otros antibióticos, en: Farmacología humana 5° ed. Masson.
- Mercado, R., Miro, E.& Mirelis, B. (2002). Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 20, pp.225-34.
- Moodley, A. & Gurdabassi, L. (2009). Transmission of IncN plasmids carrying blaCTX-M-1 between comensal *Escherichia coli* in pigs and farm workers. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53, pp.1709-1711.
- Moreno, A., Bello, H., Guggiana, D., Domínguez & González, G. (2008). Extended-spectrum betalactamases belong to CTX-M group produced by *Escherichia coli* strains isolated from animals treated with enrofloxacin. *Veterinary microbiology*, 129, pp.203-208.
- Moreno, C., González, R & Beltran C . (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza cuello*, 69, 45-50.

- O'keffe, A., Hutton, TA., Schifferli, DM. & Rankin, SC. (2010). First detection of CTX-M and SHV extended-spectrum betalactamases in *Escherichia coli* urinary tract isolated from dogs and cats in the United State. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54, pp.3489-3492.
- Poeta, P., Radhouani, H., Igrejas, G., Goncalves, A., Carvalho, C., Rodrigues, J., Vinué, L., Somalo, S. & Torres, C. (2008). Seagulls of the Berlengas Natural reserve of Portugal as carriers of faecal *Escherichia coli* harboring CTX-M and TEM extended-spectrum beta lactamases. *Applied and environmental microbiology*, 74, pp.7439-7441.
- Prats, G., Llobet, T & Margall, N.. (2009, Diciembre 1). *Escherichia Coli* O157:H7, Enterohemorrágica. *Eroski Consumer*, 5, p.20.
- Rocha, G., Cortés, G., Lozano, P., Bello, F., Martínez, I. & Torres, C. (2015). Faecal *Escherichia coli* isolates from healthy dogs harbour CTX-M-15 and CMY-2 betalactamases. *The veterinary Journal*, 24, pp. 1-5.
- Rodríguez, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud pública Mex*, 44, pp.464-475.
- Schroeder, CM., Zhao, C., DebRoy, C., Torcolini, J., Zhao, S., White, DG., Wagner, DD., McDermott, PF., Walker, RD. & Meng, J. (2002). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from human, cattle, swine and food. *Applied and environmental microbiology*, 68, pp. 576-581.
- Shaheen, BW., Nayak, R., Foley, SL., Kweon, O., Deck, J., Park, M., Rafii, F. & Boothe, DM. (2011). Molecular characterization of resistance to extended-spectrum cephalosporins in clinical *Escherichia coli* isolates from companion animal in United State. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55, pp.5666-5675.
- Sidjabat, HE., Townsend, KM., Hanson, ND., Bell, JM., Stokes, HW., Gobius, KS., Moss, SM. & Trott, DJ. (2005) .Identification of CMY-2nan associated plasmid-mediated resistance genes in multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from dogs at veterinary teaching hospital in Australia. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 57, pp.840-848.
- Sidjabat, HE., Townsend, KM., Hanson, ND., Bell, JM., Stokes, HW., Gobius, KS., Moss, SM. & Trott, DJ. (2007). Identification of plasmid-mediated extended spectrum and AmpC betalactamases in *Enterobacter spp.* Isolates from dogs. *Journal of medical microbiology*, 56, pp.426-434.
- Suárez, C., Kattán, J. Guzmán, A. & Villegas, M. (2006). Mecanismos de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. *Infection*, 10, pp. 85-93.

- Tafur, JD., Torres, JA & Villegas, MV. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias gram negativas. *Asociación colombiana de infectología*, 12, pp.217-226.
- Teshager, T., Domínguez, L., Moreno, Ma., Sáenz, Y., Torres, C. & Cardeñosa, S. (2000). Isolation of an SHV-12 betactamase-producing *Escherichia coli* strain from a dog with recurrent urinary tract infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 44, pp.3483-3484.
- Torres, C. & Zarazaga, M. (2007). BLEE en animals y su importancia en la transmisión a humanos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 25, pp.29-37.
- Torres, ME., Pírez, MC., Schelotto, F., Varela, G., Parodi, V., Allende, F., Falconi, E., Dell'Acqua, L., Gaione, P., Méndez, MV., Ferrari, AM., Montano, A., Zanetta, E., Acuña, AM., Chiparelli, H. & Ingold, E. (2001). Etiology of children's diarrhea in Montevideo, Uruguay: associated pathogens and unusual isolates. *J Clin Microbiol*, 39, pp. 2134-2139.
- Vignoli, R., Seija, V. (2008). Principales grupos de antibióticos. En Universidad de la república. Temas de bacteriología y virología médica. Univerisdad: 2 edición.
- Walsh, C. (2003). Antibiotics thatact on cell wall biosynthesis. *Antibiotics. Action, Origins, Resistance*. Wasshington DC: ASM Press.
- Watanabe, M., Iyobe, S., Inoue, M. & Mitsuhashi, S. (1991). Transferable imipenem resisitance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Ant. Agents Chemother*, 35, pp.147-151.

## 15. ANEXOS

### Anexo1

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

Criterios	Resultados
Tinción de gram (cultivo fresco)	-
Forma	Bastón
Crecimiento aerobio	+
Crecimiento anaerobio	+
Esporas	-
Movilidad	+ 0 -
Catalasa	+
Oxidasa	-
Fermentación de glucosa	+
O/F	F

#### Agar de Hierro y Triple Azúcar (TSI)

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

*E. coli* fermenta a la glucosa y lactosa produciendo ácido y dióxido de carbono, el ácido hace que el indicador rojo de fenol cambie a un color amarillo y el dióxido de carbono se observa como burbujas o grietas en el agar, no hay producción de sulfuro de hidrogeno (MacFaddin, 2003)

#### Agar de Hierro y Lisina (LIA)

Medio de cultivo utilizado para diferenciar microorganismos, principalmente a *Salmonella spp*, basado en la descarboxilación/desaminación de la lisina y producción de ácido sulfhídrico.

En el medio de cultivo la peptona y el extracto de levadura aportan los nutrientes para el desarrollo de la bacteria, la glucosa es el carbohidrato fermentable y la lisina es el sustrato utilizado para detectar la presencia de

enzimas descarboxilasa y dasaminasa. El citrato de hierro y el tiosulfato de sodio son los indicadores de la producción de ácido sulfhídrico. El púrpura de bromocresol es el indicador de pH, el cual es amarillo a pH igual o menor a 5.2 y de color violeta a pH mayor o igual a 6.8.

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

Los microorganismos que no producen la enzima lisina descarboxilasa, pero son fermentadores de la glucosa, producen un viraje total del medio de cultivo amarillo, pero a las 24 h de incubación se observara el pico de color violeta debido al consumo de la peptona y el fondo amarillo (MacFaddin, 2003).

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

### **MIO (Movilidad-Indol-Ornitina)**

Este medio es usado para la identificación del genero *Enterobacteriaceae* con base a su movilidad, actividad de ornitina descarboxilasa y producción de Indol.

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

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

### **Citrato de Simmons**

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

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

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

### **Medio Urea**

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

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

### **Agar fenilalanina**

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



En este medio el extracto de levadura es el que aporta los nutrientes para el adecuado desarrollo bacteriano. El aminoácido fenilalanina sufre desaminación oxidativa catalizada por la enzima fenilalanina desaminasa, para producir ácido fenilpirúvico y 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 ácido fenilpirúvico y los iones de  $Fe^{3+}$  (MacFaddin, 2003).

### **Vogues Proskauer**

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

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

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

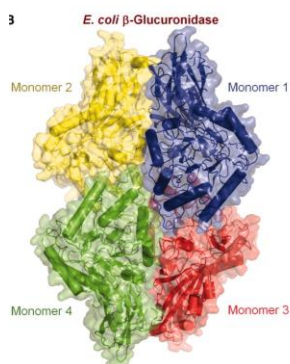
### **$\beta$ -D-glucuronidasa**

La  $\beta$ -D-gucoronidasa (GUD) es una enzima que cataliza la hidrólisis de ácido  $\beta$ -D-glucopiranosidúricos en sus correspondientes agliconas y ácido glucorónico (Prats *et al.*, 2009)



Pruebas bioquímicas de *Escherichia coli* (De derecha a izquierda: TSI, LIA, MIO, CIT, Urea, Phe, VP, RM).

Numerosos autores han demostrado que aproximadamente 94-96% de las cepas de *E. coli* y sólo unas pocas de *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia* producen esta enzima, cabe aclarar que algunas cepas patógenas de *E.coli* no producen GUD, así como tampoco otras especies del género *Escherichia* (Prats *et al.*, 2009).



Estructura tridimensional de la Beta glucoronidasa (Tomado de [www.sciencemag.org](http://www.sciencemag.org))

## Anexo 2

**Dueño**

**Edad:**

**Sexo:**

**Mascota**

**Raza:**

**Edad:**

**Sexo:**

---

**1. ¿Con qué alimenta a su mascota?**

a) Croquetas

b) Sobras de comida

c) Otros

\_\_\_\_\_

**2. ¿En qué lugar duerme su mascota?**

a) Cama del dueño

b) Piso

c) Cama especial para la mascota

d) Otro\_\_\_\_\_

**3. ¿Su mascota convive con otras mascotas?**

Sí

No

**4. ¿Qué tipo de mascotas?**

**5. ¿Con qué frecuencia baña a su mascota?**

a) Semanal

b) Cada 15 días

c) Cada mes

d)

Otros\_\_\_\_\_

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

a) Dentro de la casa

b) Patio

c) Calle

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

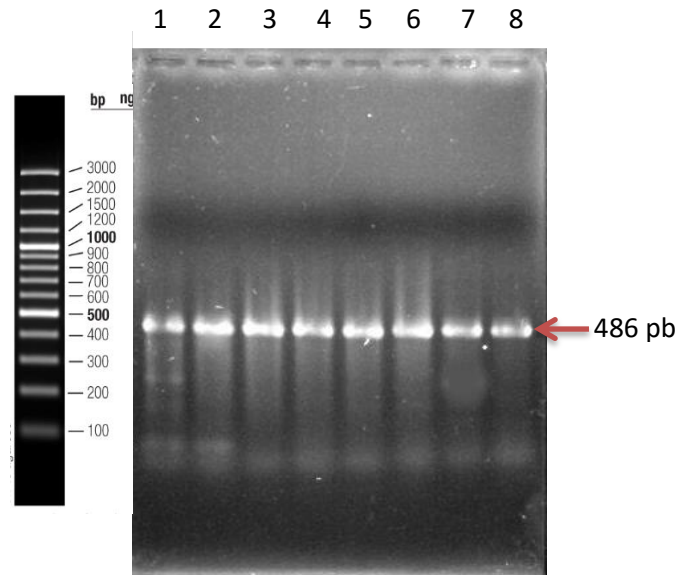
a) Si

b) No

### ANEXO 3

#### Carril

- 1.-Control positivo cepa C7200 (*E. coli*)
- 2.-EcD17
- 3.-EcD18
- 4.-EcD21
- 5.-EcD22
- 6.-EcD23
- 7.-EcM23
- 8.-EcD26

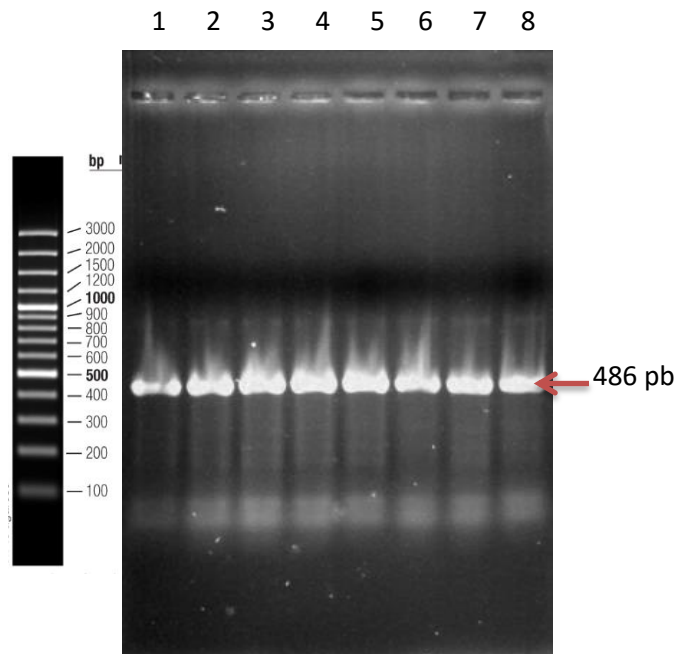


Positivas: C7200, EcD17, EcD18, EcD21, EcD22, EcD23, EcM23, EcD26

#### Corrimiento electroforético del Gen *uidA* (gel 2)

#### Carril

- 1.-Control positivo cepa C7200 (*E. coli*)
- 2.-EcM26
- 3.-EcD28
- 4.-EcM28
- 5.-EcD29
- 6.-EcM29
- 7.-EcD30
- 8.-EcD31



Positivas: C7200, EcM26, EcD28, EcM28, EcD29, EcM29, EcD30, EcD31

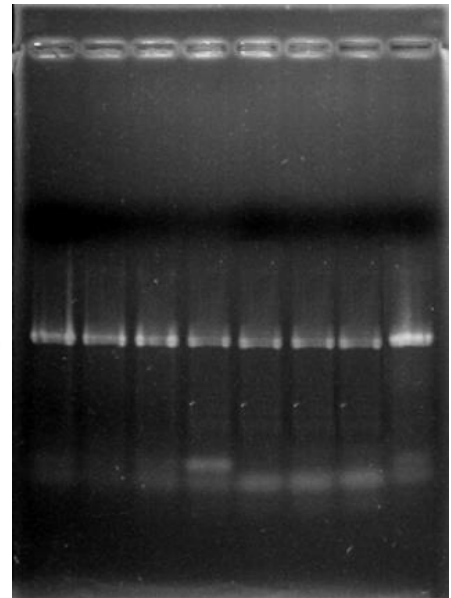
#### Corrimiento electroforético del Gen *uidA* (gel 3)

**Carril**

- 1.-Control positivo cepa C7200 (*E. coli*)
- 2.-EcM31
- 3.-EcM32
- 4.-EcD33
- 5.-EcM33
- 6.-EcM34
- 7.-EcM35
- 8.-EcM36

*Gen uidA* →  
486 pb

1 2 3 4 5 6 7 8

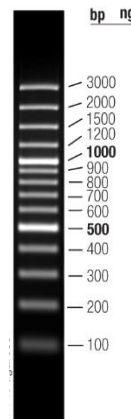


Positivas: C7200, EcM31, EcM32, EcD33, EcM33, EcM34, EcM35, EcM36

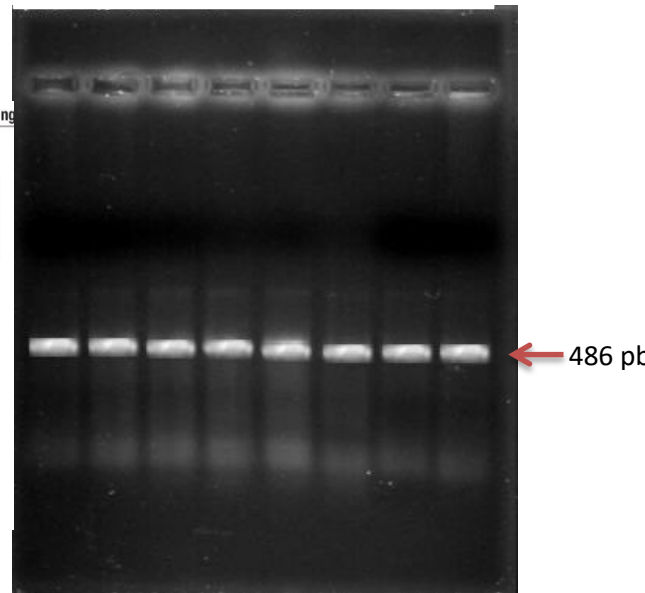
Corrimiento electroforético del Gen *uidA* (gel 4)

**Carril**

- 1.-Control positivo cepa C7200 (*E. coli*)
- 2.-EcD38
- 3.-EcD39
- 4.-EcM44
- 5.-EcM45
- 6.-EcM46
- 7.-EcM47
- 8.-EcM48



1 2 3 4 5 6 7 8



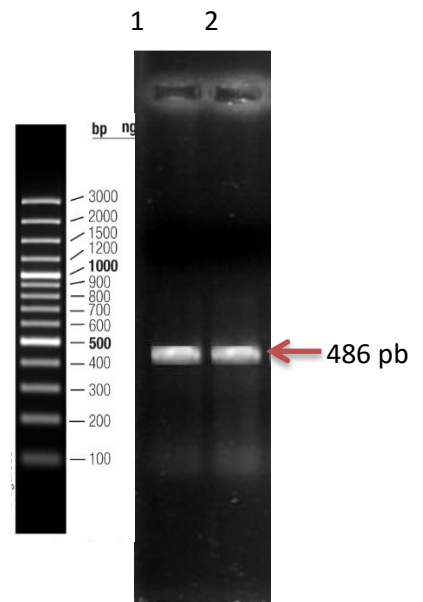
Positivas: C7200, EcD38, EcD49, EcM44, EcM45, EcM46, EcM47, EcM48

Corrimiento electroforético del Gen *uidA* (gel 5)

## Carril

1.-Control positivo cepa C7200 (*E. coli*)

2.-EcM52



Positivas: C7200, EcM52

Corrimiento electroforético del Gen *uidA* (gel 6)

## ANEXO 4

Pruebas bioquímicas de cepas de *Escherichia coli*.



Cepa EcM34 *Escherichia coli*



Cepa de EcM44 *Escherichia coli*



Cepa EcD6: *Klebsiella oxytoca*