

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**“PERFILES FENOTÍPICOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN  
AISLADOS DE *Escherichia coli* DE ORIGEN CANINO DE LA CIUDAD DE  
AMBATO”**

**DAVID GUILLERMO ROBALINO PROAÑO**

**TUTOR:** Dr. Calero Cáceres William Ricardo

**CEVALLOS-ECUADOR**

**2020**

## **APROBACIÓN**

“PERFILES FENOTÍPICOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN AISLADOS  
DE *Escherichia coli* DE ORIGEN CANINO DE LA CIUDAD DE AMBATO”

**REVISADO POR:**



Firmado electrónicamente por:

**WILLIAM RICARDO  
CALERO CACERES**

.....  
**Dr. Wiliam Calero, PhD**

**TUTOR**

## **DERECHOS DE AUTOR**

“Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “PERFILES FENOTÍPICOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN AISLADOS DE *Escherichia coli* DE ORIGEN CANINO DE LA CIUDAD DE AMBATO”, como uno de los requisitos previos para la obtención del Título de grado de Médico Veterinario Zootecnista, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no ponga una ganancia económica potencial.

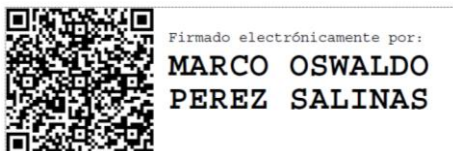
Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la Publicación de este Informe Final, o parte de él”.

## APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

“PERFILES FENOTÍPICOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN AISLADOS DE *Escherichia coli* DE ORIGEN CANINO DE LA CIUDAD DE AMBATO”

**APROBADO POR:**

**FECHA:**



.....

12/Marzo/2021

Ing. Marco Pérez Salinas, PhD

**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN**



.....

12/Marzo/2021

Dr. Darwin Villamarín Barragan, Mg.

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN**



.....

12/Marzo/2021

Dra. Sandra Margarita Cruz Quintana, PhD

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN**

## **DEDICATORIA**

A mi madre, “Sra Margarita” por nunca dejar el apoyo pese a las adversidades y tiempos extras. Se le agradece por su amor incondicional.

A mi hermano mayor, “Marco” por sus consejos y ejemplo de ser buen hijo.

Se les aprecia mucho.

**David Robalino Proaño**

## **AGRADECIMIENTO**

A mi madre, quien siempre me consiente, reta y accede a mis demandas.

A mi hermano, por el apoyo y ejemplo de ser una buena persona.

A mi mejor amigo, Andrés desde nuestra niñez seguimos en contacto a pesar de que ya te casaste; la felicidad no es para siempre, “suerte brother”

A los docentes de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia por los temas de estudio que fueron forjando en mi formación profesional.

Finalmente, a mi tutor, Doctor William Calero Cáceres quien con aprecio y entusiasmo mantuvo el apoyo incondicional durante la realización de este trabajo. “Gracias Doctor”

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

<b>CAPITULO I.- MARCO TEÓRICO</b> .....	11
1.1 Antecedentes investigativos .....	11
1.2 Objetivos .....	17
1.2.1 Objetivo general.....	17
1.2.2 Objetivos específicos.....	17
<b>CAPITULO II.-METODOLOGÍA</b> .....	18
2.1 Materiales y equipos.....	18
2.2 Métodos .....	22
2.3 Manejo del experimento .....	24
2.3.1 Obtención de aislado de <i>E. coli</i> en caninos de la ciudad de Ambato.....	24
2.3.2 Preparación de soluciones y medios de aislamiento. ....	24
2.3.3 Colocación de discos antibióticos. ....	25
2.3.4 Panel de antibióticos utilizado .....	26
2.3.5 Medición y lectura de halos de inhibición del antibiograma.....	27
2.3.6 Interpretación de resultados del antibiograma .....	28
<b>CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	29
Perfiles de Susceptibilidad mediante el Método de Difusión de Disco. ....	29
Bacterias resistentes a antimicrobianos. ....	30
Identificación de Bacterias con fenotipo BLEE.....	32
Identificación de Bacterias con fenotipo AmpC.....	32
Agrupamiento Jerárquico de los Patrones de Susceptibilidad .....	35
<b>CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES</b> .....	42
<b>4.1. CONCLUSIONES</b> .....	42
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	44

<b>ANEXOS</b> .....	49
<b>ANEXO A</b> .....	49
Fotografías .....	49
<b>ANEXO B</b> .....	51
Banco de cepas de origen canino de la ciudad de Ambato .....	51
<b>ANEXO C</b> .....	54
Halo de Inhibición en las 79 cepas de <i>E. coli</i> .....	54

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Panel de antibióticos .....	26
<b>Tabla 2.</b> Antibióticos seleccionados para BLEE y AmpC .....	26
<b>Tabla 3.</b> Interpretación de Halos de Inhibición .....	27
<b>Tabla 4.</b> Evaluación de la cantidad de cepas de <i>E. coli</i> , resistentes por cada antibiótico.....	30
<b>Tabla 5.</b> Identificación de cepas con fenotipo BLEE Y AmpC .....	32
<b>Tabla 6.</b> Codificación de cepas de <i>Escherichia coli</i> positivas a BLEE y AmpC.....	33

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Colocación de discos Antibióticos .....	28
<b>Figura 2.</b> Cepas bacterianas frente al panel de antibióticos .....	31
<b>Figura 3.</b> Árbol de análisis jerárquico .....	36
<b>Figura 4.</b> Dendograma de las pruebas de susceptibilidad .....	37



## RESUMEN

La resistencia bacteriana a antibióticos constituye un problema global, tanto en medicina humana como en veterinaria. La evolución descontrolada de los mecanismos de resistencia que han generado dichos microorganismos ha influido de forma negativa en las opciones terapéuticas eficaces. Esta investigación se ha enfocado en la enterobacteria *Escherichia coli*, en especial en los clones productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y betalactamasas de tipo AmpC, las cuales representan variantes con mecanismos de resistencia de gran impacto clínico en las bacterias Gram negativas. En nuestro país, son pocos los datos epidemiológicos disponibles sobre *E. coli* productora de BLEE y AmpC en animales. En el presente estudio, se evaluó los perfiles fenotípicos de resistencia a antibióticos en una colección de aislados de *E. coli* de origen canino de la ciudad de Ambato, mediante el método de difusión en disco “Kirby&Bauer”, detectando que el 72,2% (57/79) de aislados poseen un fenotipo BLEE y 81% (64/79) de los aislados con manifestación del fenotipo AmpC. Además, de hallar resistencia fenotípica para: Ampicilina 100% (79/79), Vancomicina 100% (79/79), Cefotaxima 98.7% (78/79), Eritromicina 98.7% (78/79), Ceftriaxona 97.5% (77/79); y patrones de sensibilidad fenotípica para antimicrobianos como: Meropenem 98.7% (78/79), Imipenem 96.2% (76/79) Piperacilina/Tazobactam 84.8% (67/79), Cefoxitin 83,5% (66/79), y Amikacina 82.3% (65/79). Los patrones de resistencia bacteriana detectados y las diferencias entre el origen de los aislamientos permitirán utilizar esta información de base para estudios retrospectivos de resistencia antimicrobiana.

**Palabras clave:** *Escherichia coli*, Kirby&Bauer, Resistencia antimicrobiana, caninos, BLEE y AmpC.

## ABSTRACT

Currently, antibiotic resistance crisis is a global concern, both in human and veterinary medicine. The uncontrolled evolution of the resistance mechanisms in bacteria has had a negative influence on effective therapeutic options. This research has focused on the enterobacterium *Escherichia coli*, focused on the detection of the extended spectrum beta-lactamases (ESBL) and AmpC type beta-lactamases, which represent variants with resistance mechanisms of great clinical impact in Gram negative bacteria. In Ecuador, few epidemiological data are available on *E. coli* producing ESBL and AmpC in animals. In the present study, the phenotypic profiles of resistance to antibiotics were evaluated in a collection of isolates of *E. coli* of canine origin from the city of Ambato, using the Kirby & Bauer disk diffusion method, detecting that 72.2% (57/79) of isolates have an ESBL phenotype and 81% (64/79) of isolates with manifestation of the AmpC phenotype. The percentages of resistance for the evaluated antibiotics was: Ampicillin 100% (79/79), Vancomycin 100% (79/79), Cefotaxime 98.7% (78/79), Erythromycin 98.7% (78/79), Ceftriaxone 97.5% (77 / 79); and phenotypic sensitivity patterns for antimicrobials such as: Meropenem 98.7% (78/79), Imipenem 96.2% (76/79) Piperacillin / Tazobactam 84.8% (67/79), Cefoxitin 83.5% (66/79), and Amikacin 82.3% (65/79). The patterns of bacterial resistance detected and the differences between the origin of the isolates will allow to use this background information for retrospective studies of antimicrobial resistance.

**Keywords:** *Escherichia coli*, Kirby & Bauer, Antimicrobial resistance, canines, ESBL and AmpC.

## CAPITULO I.- MARCO TEÓRICO

### 1.1 Antecedentes investigativos

El incremento descontrolado de la resistencia a los antibióticos por parte de las bacterias disminuye las alternativas para el tratamiento de enfermedades, lo que ha convertido en un problema de importancia en todas partes del mundo, afectando algunos microorganismos como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, y *Salmonella spp* (Marston et al., 2016). Las consecuencias directas de una infección provocada por estas bacterias resistentes pueden ser graves, tanto en medicina veterinaria como en el tratamiento de infecciones en humanos. La resistencia a antibióticos afecta a todo el sector de salud pública; dada la importancia del problema, se han puesto en marcha programas de vigilancia y monitoreo de resistencia antimicrobiana (Van Puyvelde et al., 2018). Las bacterias se han caracterizado por adquirir fácilmente nuevos mecanismos de defensa a antimicrobianos. Esto se ha dado por el uso indiscriminado de antibióticos de primera línea para tratar enfermedades frecuentes en la clínica como: penicilinas, cefalosporinas, quinolonas y aminoglucósidos, por lo cual es necesario tomar las medidas necesarias para el control y uso óptimos de los mismos (López-Velandia et al., 2015).

Como ocurre en medicina humana, en veterinaria los antibióticos son empleados para tratar, controlar y prevenir enfermedades causadas por bacterias y otros microorganismos, muchas de estas requieren la administración de medicamentos como forma de tratamiento para aliviar el sufrimiento del paciente, las infecciones respiratorias y urinarias son reportadas a consulta diaria; sin embargo, los síndromes gastrointestinales presentan mayor prevalencia, cuya predisposición abarca desde una corta edad de vida en adelante siendo el 78% por Enterobacterias y el 22% de bacterias Gram positivas (Lee et al., 2015; Shaikh et al., 2015). La diarrea en perros y gatos es una de las

afecciones más frecuentes en la clínica veterinaria, siendo de gran importancia un diagnóstico rápido y eficaz, principalmente en cachorros, para poder implementar a tiempo el tratamiento correspondiente. La salud del tracto digestivo depende de varios factores como: la microbiota intestinal normal, mecanismos inespecíficos que limitan el número de bacterias y del sistema inmunitario gastrointestinal (**Zotta et al., 2015**). Cuando alguno de estos factores falla, ya sea por alguna enfermedad o por la aplicación de agentes antimicrobianos, lleva al mal funcionamiento del intestino y a diarrea con ausencia de patógenos. Muchos de estos son habitantes normales del tracto gastrointestinal, lo que nos indica que no sólo su presencia es determinante de la diarrea, es así que el primer paso en la selección de un antibiótico adecuado consiste en conocer a la bacteria específica. Esto se puede lograr mediante un cultivo (**CLSI, 2015**).

El uso de betalactámicos como penicilinas y cefalosporinas en la clínica diaria encabeza la lista de antibióticos usados para la mayoría de signologías y patologías frecuentes, debido a su historia de 25 años de aceptación, reducidos efectos colaterales y relativo bajo costo (**Drawz & Bonomo, 2010**). El uso de nuevas gamas de antimicrobianos frente a enfermedades comunes debido a cepas productoras de betalactamasas se ha implementado, a pesar de la falla inicial del tratamiento con amoxicilina y la posterior respuesta a la amoxicilina-clavulanato. El clavulanato es un potente inhibidor de la enzima betalactamasa producida por *H. influenzae* y *M. catarrhalis*, neutralizando sus efectos y permitiendo que la amoxicilina elimine a los organismos (**Boehmer et al., 2018**). La prescripción inconsciente de antibióticos en el sector pecuario tanto como animales de compañía, así como destinados a la producción para el consumo humano (**Hughes, 2014**). En la actualidad existe un gran porcentaje de cepas bacterianas resistentes a antibióticos de última generación (**Mendelson et al., 2018; Sun et al., 2018**). A nivel mundial existen diferentes estudios semejantes realizados en varios países, cuyo resultado ha sido alarmante en salud pública. En el Ecuador, existen pocos estudios que detallan esta problemática emergente (**Ortega-Paredes et al., 2016; Sánchez-Salazar et al., 2019; Vinueza-Burgos et al., 2019**).

Las betalactamasas son enzimas producidas por bacterias que inactivan estos antibióticos al hidrolizar el anillo betalactámico de los mismos. La mayoría de betalactamasas inactivan penicilinas o cefalosporinas, pero algunas son capaces de inactivar ambos tipos de antibióticos (**Castañeda et al., 2016**). La mayoría de bacterias Gram positivas secretan sus betalactamasas de forma que los agentes antimicrobianos betalactámicos son inactivados extracelularmente, en el medio que las rodea. En contraste, las betalactamasas de las bacterias Gram negativas permanecen dentro de la célula e inactivan los betalactámicos en el espacio periplásmico, es decir en el espacio entre la membrana externa y la membrana citoplásmica (**Huanca, 2014**).

Los genes que codifican a las betalactamasas pueden ubicarse a nivel cromosómico o plasmídico (**Canton et al., 2012**). La producción de betalactamasa inducible se inicia cuando las bacterias que poseen un gen, se exponen a un agente betalactámico (**López-Velandia et al., 2015**). La acción de los agentes antimicrobianos en la pared celular activa un mecanismo genético en cascada que inicia la producción de betalactamasas. La producción de betalactamasas cesa ante la ausencia de los agentes antimicrobianos en la pared celular o alrededor de ella (**Huanca, 2014**).

Las betalactamasas de espectro expandido (BLEE), son enzimas derivadas por mutaciones de las betalactamasas clásicas del grupo 2b de la clasificación de Bush. Se encuentran codificadas en plásmidos conjugativos, lo cual facilita su diseminación, no sólo entre distintas cepas de la misma especie, sino también entre bacterias de distintos géneros y grupos (**Miranda García, 2013**). Además, con otros determinantes genéticos de resistencia transferibles. Los diferentes tipos de BLEE confieren un grado de resistencia muy variable, la intensidad de hidrólisis de un determinado antibiótico difiere según las cepas consideradas, pudiendo incluso no tener efecto fenotípicamente detectable en algunos casos en los que únicamente tiene lugar un aumento de la concentración inhibitoria mínima, confieren resistencia a las cefalosporinas de tercera generación y al aztreonam (**Ghimire & , Bipesh Acharya, 2017**).

Los genes que codifican las BLEE y los que codifican la resistencia a otros antimicrobianos, pueden residir en el mismo plásmido conjugativo y se transmiten juntos de un microorganismo a otro, confiriendo el perfil de resistencia antibiótica múltiple (**Xia et al., 2014**). Desde la primera detección de una BLEE en un aislado de *E. coli* de un perro de laboratorio en Japón en 1998, se ha informado de una variedad de BLEE, incluidas BLEE de tipo CTX-M, y pAmpC para bacterias derivadas de perros, gatos y otros animales de compañía en todo el mundo. Por lo tanto, tales cepas bacterianas pueden proporcionar un reservorio para bacterias productoras de BLEE y / o pAmpC para humanos. Otro acontecimiento preocupante es que recientemente se aislaron cepas de *E. coli* humanas altamente virulentas de la pandemia B2-O25: H4-ST131 CTX-M-15 de animales de compañía pertenecientes a diferentes especies en varios países europeos (**Tamang et al., 2012**).

Actualmente, las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), las betalactamasas con sensibilidad reducida a los inhibidores de betalactamasas, las betalactamasas AmpC mediadas por plásmidos y las betalactamasas que hidrolizan Carbapenem, representan diferentes tipos de enzimas que han llegado a ser importantes en nuevos aislamientos clínicos en la resistencia de bacterias Gram negativas (**Castañeda et al., 2016**). de acuerdo a la clasificación de los grupos C, A y D, A y B de la clasificación de “Ambler” o a los grupos 1, 2 2be y 3a, 3b, y 3c de la clasificación de Bush, algunas *E. coli* presentan un gen AmpC cromosomal que se expresa de manera constitutiva, Sin embargo, recientemente se ha descrito la transferencia horizontal de los genes AmpC desde *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii* y otros, hacia especies como *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Salmonella ssp*, a través de plásmidos que acarrean los componentes para la resistencia antimicrobiana (**Ljungquist et al., 2016**).

En pacientes caninos de hospitales en Corea, en el 2012 se reportó la prevalencia de *E. coli*, evaluando rasgos epidemiológicos moleculares de este organismo. De un total de 63 aislados, obtenidos de hisopados rectales de perros. Se evidenció 33,3% (21/63) correspondientes a BLEE de tipo CTX-M y 23,8% (15/63) de enzimas AmpC. Como

resultado, se sugiere que la transferencia clonal y horizontal de plásmidos en cepas de *E. coli*, ejerce un papel en la propagación de genes de resistencia a los antimicrobianos además en la y esta traspaso entre especies humanos y perros (So et al., 2012).

Un estudio realizado en nueve jardines públicos en Copenhague, Dinamarca. Demostró la prevalencia observada del 1,9% (4/209) de *E. coli* productora de BLEE en depósitos fecales de perros. El estrecho contacto entre perros y humanos implica riesgos de transmisión zoonótica para una variedad de patógenos, especialmente por la vía fecal-oral, por medio de las excretas de estos animales puede convertirse en una fuente de bacterias resistentes clínicamente relevantes que pueden transmitirse a los seres humanos a través de la exposición directa o mediante la contaminación de los entornos domésticos y públicos (Damborg et al., 2015). Sin embargo, estudios realizados en diferentes zonas de Países bajos demostró un alto nivel de prevalencia de enterobacterias productoras de BLEE / AmpC en perros sanos (45%) y tanto perros con diarrea (55%) como gatos (25%), tomadas de muestras fecales, de los cuales se encontraron grandes cantidades de *E. coli* o *P. mirabilis* (Hordijk et al., 2013).

En Nueva Zelanda, una investigación analizó 115 aislamientos, de los cuales 74 (64%) procedían de perros y 29 (25%) de gatos. Se identificaron siete especies bacterianas, de las cuales *E. coli* fue la más común (87/115, 76%). De los 115 aislamientos, 10 (9%) expresaron el fenotipo BLEE, 43 (37%) el fenotipo AmpC y siete (6%) ambos fenotipos BLEE y AmpC. De los 60 aislados productores de BLEE y AmpC, 36 (60%) eran *E. coli*. Entre estos aislamientos, 27/60 (45%) se clasificaron como multirresistentes, en comparación con 15/55 (27%) aislamientos no productores de BLEE o AmpC ( $p < 0,01$ ). Noventa y cinco aislamientos fueron resistentes a amoxicilina-ácido clavulánico y 58 (61%) de estos fueron productores de BLEE o AmpC. Los genes BLEE predominantes fueron *bla*<sub>CTX-M-14</sub> y *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, y el gen AmpC codificado por el plásmido dominante era *bla*<sub>CMY-2</sub>. Se identificaron 38 tipos de secuencia multilocus (ST) de *E. coli*, y los más prevalentes fueron ST12 (12/89, 13%), ST131 (6/89, 7%) y ST648 (6/89, 7%). Los

aislados productores de BLEE y AmpC representaron 35/1082 (3,2%) de las enterobacterias aisladas por una red de laboratorios durante el período de estudio **(Karkaba et al., 2017)**.

El primer gen pAmpC, el gen CMY-1, se informó en 1989; desde entonces, se han aislado varios tipos de pAmpC a partir de aislados clínicos de *Enterobacteriaceae* en todo el mundo. En la República de Corea, las AmpC se han detectado cada vez más, y en un estudio realizado entre octubre de 2008 y julio de 2009 entre pacientes de 68 centros de atención a largo plazo en todo el país, se detectó DHA-1 en el 39,3%. Se identificaron aislados de *K. pneumoniae* y DHA-1, CMY-2 y CMY-6 en el 3,1% de los aislados de *E. coli*. Los animales de compañía, como los perros, juegan un papel importante en el intercambio de determinantes de la resistencia a los antimicrobianos en las poblaciones bacterianas, ya que están expuestos a agentes antimicrobianos (para tratamiento) similares a los que se utilizan en humanos. También comparten el mismo entorno que los humanos y permanecen en estrecho contacto con ellos. La posibilidad de transmisión entre especies de estas cepas multirresistentes de humanos a animales de compañía y viceversa es un asunto de gran preocupación para la salud pública, que las heces de los perros son un vector para la diseminación de *E. coli* productora de betalactamasas **(Tamang et al., 2012)**.

El objetivo de esta investigación se centra en detectar fenotípicamente perfiles de resistencia a antibióticos de cepas bacterianas con características BLEE y AmpC en 79 aislados de *E. coli*, provenientes de caninos domésticos y callejeros de la ciudad de Ambato, durante el 2018; mediante la técnica de Kirby-Bauer siguiendo las recomendaciones del CLSI.



## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo general**

Determinar los perfiles fenotípicos de resistencia a antibióticos en aislados de *Escherichia coli*, de origen en caninos de la ciudad de Ambato

### **1.2.2 Objetivos específicos**

- Evaluar los perfiles de resistencia y sensibilidad a antibióticos en aislados de *E. coli*, por ensayos de difusión en disco.
- Identificar los perfiles fenotípicos en *E. coli* con resistencia antimicrobiana por el método ESBL (Espectro extendido de Betalactamasas) en caninos de la ciudad de Ambato.
- Identificar los perfiles fenotípicos en *E. coli* con resistencia antimicrobiana por el método AmpC (Serin-Betalactamasa), en caninos de la ciudad de Ambato.

## CAPITULO II.-METODOLOGÍA

### 2.1 Materiales y equipos

<b>Detalle - Equipos de laboratorio</b>	<b>Cantidad</b>
Autoclave M11 Ultra clave MIDMARK	1
Balanza analítica Cap. 150g (1g)	1
Estufa bacteriológica +5°C – 120°C	1
Incubador bacteriológico	1
Mechero Bunsen	1
Fuente de poder	1
Nevera (4° C)	1
Congelador (-20°C)	1
Cabina de flujo laminar Bioseguridad 2	1
Microcentrífuga Sorvall Legend Micro i7	1
Micropipeta 1000µL	1
Micropipeta 200 µL	2
Micropipeta 100 µL	1

<b>Detalle - Instrumentos de laboratorio</b>	<b>Cantidad</b>
Espátula	1
Asa de inoculación	1
Matraz de 300ml	1
Cajas mono Petri plásticas	1
Pipetas estériles de plástico de 10ml	1
Mechero de alcohol	1
Puntas de micropipeta de 10, 20 y 100 µL	100 de c/u
Gradillas	5
Tubos Eppendorff	100
Tubos de ensayo con tapa	40
Botellas de tapa azul de 1000 mL	2
Botellas de tapa azul de 500 mL	3
Botellas de tapa azul de 100 mL	5
Hisopos	100
Regla para medir Halos de inhibición	1

<b>Detalle - Reactivos para el laboratorio</b>	<b>Cantidad</b>
Agar McConkey	100
Agar Mueller-Hinton	500 g
Caldo triptona soya	250 g
Caldo LB (Luria Bertani)	250 g
Agua Destilada	10 litros
Ceftriaxona	50 g

<b>Detalle - Reactivos para antibiograma</b>	<b>Cantidad</b>
Amikacina - AK30	100
Gentamicina - CN10	100
Piperacilina / Tazobactam - TZP 110	100
Aztreonam - ATM 30	100
Amoxicilina / Ac. Clavulánico - AMC30	100
Ampicilina / Sulbactam - SAM 20	100
Meropenem - MEM 10	100
Imipenem - IMP10	100
Cefepime - FEP30	100
Ceftriaxona - CRO30	100
Ceftazidima – CAZ30	100
Cefotaxima - CTK 30	100
Cefoxitin - FOX30	100
Ciprofloxacina - CIP 5	100
Ac. Nalidíxico - NA 30	100
Eritromicina - E 15	100
Colistina - CT 10	100
Sulfametoxazol / Trimetropin - SXT 25	100
Vancomicina - VA 30	100
Ampicilina - AMP 10	100
Enrofloxacin - ENR 5	100

<b>Detalle - Insumos de laboratorio</b>	<b>Cantidad</b>
Mascarillas	1 caja
Guantes de examinación (nitrilo)	2 cajas
Cinta testigo de esterilización	1 rollo
Papel aluminio	1 rollo
Papel Kraft	1 rollo
Alcohol industrial	1 litro
Alcohol antiséptico	1 litro
Gel antibacterial	1 litro
Jabón líquido	1 litro
Cloro	5 litros

<b>Detalle - Materiales de escritorio</b>	<b>Cantidad</b>
Computadora	1
Cámara fotográfica	1
Hojas de papel bond A4	1 paquete
Impresora	1
Cuaderno de laboratorio	1
Marcador para CD	1
Esferos	5 unidades

## **2.2 Métodos**

### **2.2.1 Localización del área de estudio**

La presente investigación corresponde a la tercera etapa del estudio sobre la presencia de genes de resistencia a antibióticos emergentes *E. coli* de origen canino en la ciudad de Ambato, cuyas cepas bacterianas fueron aisladas e identificadas durante los meses de Diciembre 2017– Junio de 2018.

Las muestras analizadas fueron tomadas en 2 diferentes clínicas veterinarias en la ciudad de Ambato, provincia de Tungurahua “CVSP Y CVPP”, en 3 diferentes albergues de animales callejeros (caninos) “Callejeros” de la misma ciudad, y en el Hospital Veterinario de la Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias Agropecuarias – Querochaca “HDV”.

### **2.2.2 Ubicación del laboratorio**

Esta investigación se llevó a cabo en el laboratorio del grupo de investigación UTA-RAM (One Health), de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, localizada en el cantón Cevallos, sector Querochaca.

Su clima es considerado templado. Sus coordenadas geográficas corresponden a 1°22'02" de latitud sur y 78°36'20" de longitud oeste, con una altura de 2860 msnm, con una temperatura de 16°C, una precipitación anual de 517,8 mm, una humedad relativa de 81% y velocidad del viento de 5.2 m/s (INAMHI, 2014).

### **2.2.3 Características del lugar**

Para el análisis de este estudio se utilizaron los laboratorios de investigación de Microbiología Ambiental y Agrícola, Microbiología Veterinaria y Biología molecular

pertenecientes a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.

El laboratorio cuenta con condiciones de un ambiente controlado, conservándose a una temperatura promedio de 20°C y una humedad relativa de 48%, las condiciones de incubación bacteriológica se detallan para cada uno de los experimentos.

#### **2.2.4 Factores de estudio**

- Detección fenotípica de resistencia antimicrobiana a través de los métodos: AmpC (Piperacilina/Tazobactam, Imipenem y Ceftazidina) y BLEE (Amoxicilina/Ac. Clavulánico, Cefepime, Ceftriaxona y Ceftazidina).
- Detección de resistencia o sensibilidad fenotípica a los antibióticos: Amikacina, Gentamicina, Aztreonam, Ampicilina/Sulbactam, Meropenem, Cefotaxima, Cefoxitin, ciprofloxacina, Ac. Nalidíxico, Eritromicina, Colistina, Sulfametoxazol / Trimetropin, Vancomicina, Ampicilina y Enrofloxacina.

#### **2.2.5 Tratamientos**

La presente investigación es de tipo observacional descriptivo, por tanto, no existe tratamiento alguno.

#### **2.2.6 Diseño experimental**

La investigación emplea un diseño de tipo observacional-descriptivo de los perfiles de resistencia de un banco de microorganismos definido. En la cual, se incluye metodología cuali-cuantitativa, con la finalidad de evaluar las diferencias en los perfiles de resistencia

mediante el empleo de un dendograma de relación jerárquica entre los fenotipos detectados.

## **2.3 Manejo del experimento**

### **2.3.1 Obtención de aislado de *E. coli* en caninos de la ciudad de Ambato**

Las cepas utilizadas de la investigación fueron obtenidas por hisopados rectales, aisladas, identificadas y confirmadas por estudio microbiológico y molecular, las mismas proceden de tres centros clínicos veterinarios, y un refugio de perros callejeros y fueron caracterizadas preliminarmente en la tesis de Médico Veterinario y Zootecnista de Eduardo Javier Núñez Arcos; En la presente investigación de un banco total de 114 cepas, se analizó 79 aislados de *E. coli*. El resto de aislamientos corresponde a clones duplicados.

### **2.3.2 Preparación de soluciones y medios de aislamiento.**

#### **➤ Caldo Triptona Soya (TSB)**

- ✓ **Preparación:** se suspende 30 g de solución en un litro de agua destilada, mezclar en la platina de calentamiento hasta su disolución, se coloca en la autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- ✓ **Inoculación:** usando un asa de siembra bacteriológica estéril, se toma una muestra de cada uno de los aislados de *E. coli* criopreservados, se procede a suspendiendo las bacterias en 5 ml de TSB en un tubo de ensayo, se incuba a 37°C durante 24 horas (over night-O/N).

Con una micropipeta de 200 µl se coloca 0.2ml de la solución incubada en un tubo de ensayo con 5 ml de TSB, se procede a incubar a 37°C durante 30 a 45 minutos, hasta obtener una densidad (turbidez) óptica de 0,5 de la escala de Mc Farland.



➤ **Agar Mueller-Hinton**

- ✓ **Preparación:** se suspende 38 g del medio en 1 litro de agua destilada, se calienta en la platina de calentamiento agitando frecuentemente e hirviendo por 1 minuto, se esteriliza la solución en la autoclave a 121°C durante 15 minutos y enfriando a 45°C a 50°C.
- ✓ **Inoculación:** usando la cabina de flujo laminar bioseguridad II, se dispensó 5 ml del agar en placas Petri de vidrio y 20 ml de agar en placas Petri de plástico. Dejando reposar por 10 minutos hasta que la solución tome rigidez.
- ✓ **Siembra:** se etiquetó las placas en dependencia de la cepa estudiada, se procede a sumergir en hisopo estéril en el tubo de ensayo que contiene el organismo aislado, cuyo exceso se reduce realizando presión contra las paredes internas del tubo.

Inmediatamente, se sembró con el hisopo la superficie seca de la placa Petri tres veces sobre toda su superficie procurando una distribución simétrica.

### **2.3.3 Colocación de discos antibióticos.**

Se coloca los discos de panel de antibióticos seleccionados en la tabla 1 y 2, sobre la superficie del agar utilizando pinzas anatómicas estériles, aplicándolas con ligera presión en una distribución de más de 15 milímetros sobre el borde de la placa y de más de 30 milímetros entre discos descrita en la figura 1, cuya finalidad es no disminuir los diámetros de difusión del antibiótico. En las placas de 100 mm utilizadas no se colocaron más de 4 discos de antibióticos.

Una vez preparado el medio y colocados los discos de antibióticos, se procedió a incubarlos por 37°C por 18 a 24 horas considerando su colocación invertida para que el agua condensada no resbale al agar, precautelando un cambio indeseado en las condiciones del medio y en su posterior lectura.

### 2.3.4 Panel de antibióticos utilizado

**Tabla 1. Panel de antibióticos**

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

**Fuente:** (Autor, 2020)

**Tabla 2. Antibióticos seleccionados para BLEE y AmpC**

#### **Antibióticos para BLEE**

Piperacilina / Tazobactam	TZP 110	>21	18-20	<17
Imipenem	IMP10	>23	20-22	<19
Ceftazidina	CAZ30	>21	18-20	<17

#### **Antibióticos para AmpC**

Amoxicilina/Ac. Clavulánico	AMC30	>18	14-17	<13
Cefepime	FEP30	>25	19 - 24	<18
Ceftriaxona	CRO30	>23	20-22	<19
Ceftazidina	CAZ30	>21	18-20	<17

**Fuente:** (Autor, 2020)

### 2.3.5 Medición y lectura de halos de inhibición del antibiograma.

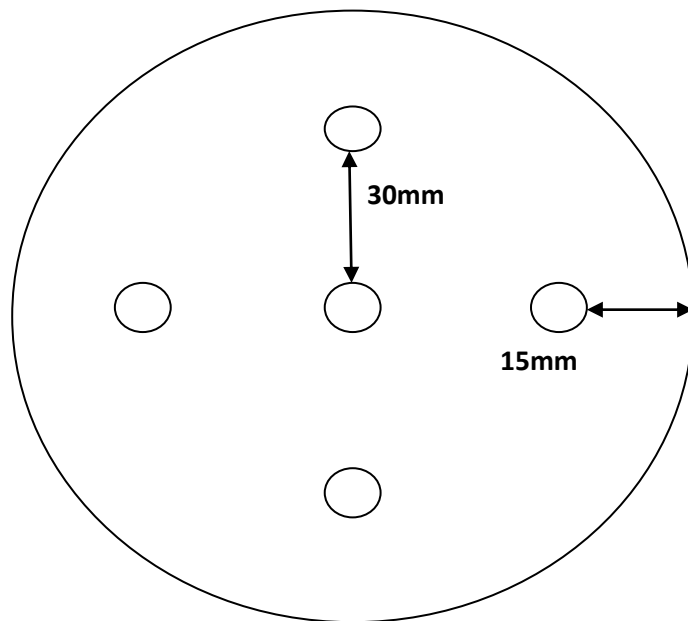
Después de la incubación con una regla se procede a medir los halos de inhibición formados, cuyos datos son redondeados hasta el próximo milímetro, registrando los datos en los respectivos registros, descrito en tabla 3.

**Tabla 3. Interpretación de Halos de Inhibición**

<b>Antibiótico</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Sensible</b>	<b>Intermedio</b>	<b>Resistente</b>
Amikacina	AK30	>17	15-16	<14
Gentamicina	CN10	>15	13-14	<12
Piperacilina / Tazobactam	TZP 110	>21	18-20	<17
Aztreonam	ATM 30	>21	18-20	<17
Amoxicilina/Ac. Clavulanico	AMC30	>18	14-17	<13
Ampicilina / Sulbactam	SAM 20	>15	12-14.	<11
Meropenem	MEM 10	>23	20-22	<19
Imipenem	IMP10	>23	20-22	<19
Cefepime	FEP30	>25	19 - 24	<18
Ceftriaxona	CRO30	>23	20-22	<19
Ceftazidina	CAZ30	>21	18-20	<17
Cefotaxima	CTK 30	>26	23-25	<22
Cefoxitin	FOX30	>18	15-17	<14
ciprofloxacina	CIP 5	>21	16-20	<15
Ac. Nalidíxico	NA 30	>19	14-18	<13
Eritromicina	E 15	>23	14 - 22	<13
Colistina	CT 10	>11		<10
Sulfametoxazol / Trimetropin	SXT 25	>16	11-15.	<10
Vancomicina	VA 30	>17	15 - 16	<14
Ampicilina	AMP 10	>17	14-16	<13
Enrofloxacina	ENR 5	>23	17 - 22	<16

**Fuente:** (CLSI, 2020)

**Figura 1. Colocación de discos Antibióticos**



**Fuente:** (Navarro et al., 2011).

### **2.3.6 Interpretación de resultados del antibiograma**

Los resultados de sensibilidad se clasificaron en las tres categorías según las tablas del CLSI: sensible (S), intermedio (I) o resistente (R) (CLSI, 2015).

Para el procesamiento de la información se utilizó el programa Microsoft Excel 2018. Los dendogramas de relación jerárquica entre fenotipos de resistencia se los ejecutó con el programa MultiExperiment Viewer versión 4.9.0.

## CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Resultados

#### Perfiles de Susceptibilidad mediante el Método de Difusión de Disco.

Los laboratorios médicos alrededor del mundo han estandarizado métodos que permiten analizar la susceptibilidad de un agente bacteriano, frente a un panel de antibióticos; mismos que cuentan con normativas y registros globales que verifican el uso de los medicamentos más oportunos para combatir infecciones (CLSI, 2015). En la presente investigación de un banco total de 114 cepas, se analizó 79 aislados de *E. coli*, contra los 21 antibióticos utilizados frecuentemente en la clínica diaria veterinaria, en el área de fauna convencional; obteniéndose información de la evolución temporal y geográfica que presenta esta bacteria en la actualidad.

En la tabla 4, se observa que la mayoría de las cepas de *E. coli* presenta una resistencia marcada en antibióticos como: Ampicilina 100% (79/79), Vancomicina 100% (79/79), Cefotaxima 98.7% (78/79), Eritromicina 98.7% (78/79), Ceftriaxona 97.5% (77/79). Por otra parte, la misma bacteria presenta menor perfil de resistencia en medicamentos como: Sulfametoxazol /Trimetropin 79.7% (63/79), Aztreonam 73.4% (58/79), Cefepime 72.2% (57/79), Acido Nalidíxico 67.1% (53/79), Ciprofloxacina 63.3% (50/79), y Enrofloxacin 57% (45/79).

En contraste, entre los antibióticos que presentaron una respuesta de sensibilidad fenotípica frente a la colección de bacterias evaluada, encontramos a: Meropenem 98.7% (78/79), Imipenem 96.2% (76/79) Piperacilina/Tazobactam 84.8% (67/79), Cefoxitin 83.5% (66/79), Amikacina 82.3% (65/79), Colistina 72,2% (57/79), Gentamicina 70,9% (56/79) y Amoxicilina/Ac. Clavulánico 51.9% (41/79).

**Tabla 4. Evaluación de la cantidad de cepas de *E. coli*, resistentes por cada antibiótico**

Antibiótico	BLEE Y AmpC	Resistentes	%	Intermedias	%	Sensibilidad	%	Total C.	Total %
Amikacina		5	6,3	9	11,4	65	82,3	79	100
Gentamicina		21	26,6	2	2,5	56	70,9	79	100
Piperacilina / Tazobactam	AmpC	2	2,5	10	12,7	67	84,8	79	100
Aztreonam		58	73,4	10	12,7	11	13,9	79	100
Amoxicilina/A c. Clavulánico	BLEE	17	21,5	21	26,6	41	51,9	79	100
Ampicilina / Sulbactam		22	27,8	28	35,4	29	36,7	79	100
Meropenem		0	0,0	1	1,3	78	98,7	79	100
Imipenem	AmpC	0	0,0	3	3,8	76	96,2	79	100
Cefepime	BLEE	57	72,2	19	24,1	3	3,8	79	100
Ceftriaxona	BLEE	77	97,5	2	2,5	0	0,0	79	100
Ceftazidina	BLEE	23	29,1	23	29,1	33	41,8	79	100
Ceftazidina	AmpC	28	35,4	15	19,0	36	45,6	79	100
Cefotaxima		78	98,7	1	1,3	0	0,0	79	100
Cefoxitin		10	12,7	3	3,8	66	83,5	79	100
ciprofloxacina		50	63,3	7	8,9	22	27,8	79	100
Ac. Nalidíxico		53	67,1	12	15,2	14	17,7	79	100
Eritromicina		78	98,7	1	1,3	0	0,0	79	100
Colistina		21	26,6	1	1,3	57	72,2	79	100
Sulfametoxazo l/ Trimetropin		63	79,7	0	0,0	16	20,3	79	100
Vancomicina		79	100,0	0	0,0	0	0,0	79	100
Ampicilina		79	100,0	0	0,0	0	0,0	79	100
Enrofloxacina		45	57,0	23	29,1	11	13,9	79	100

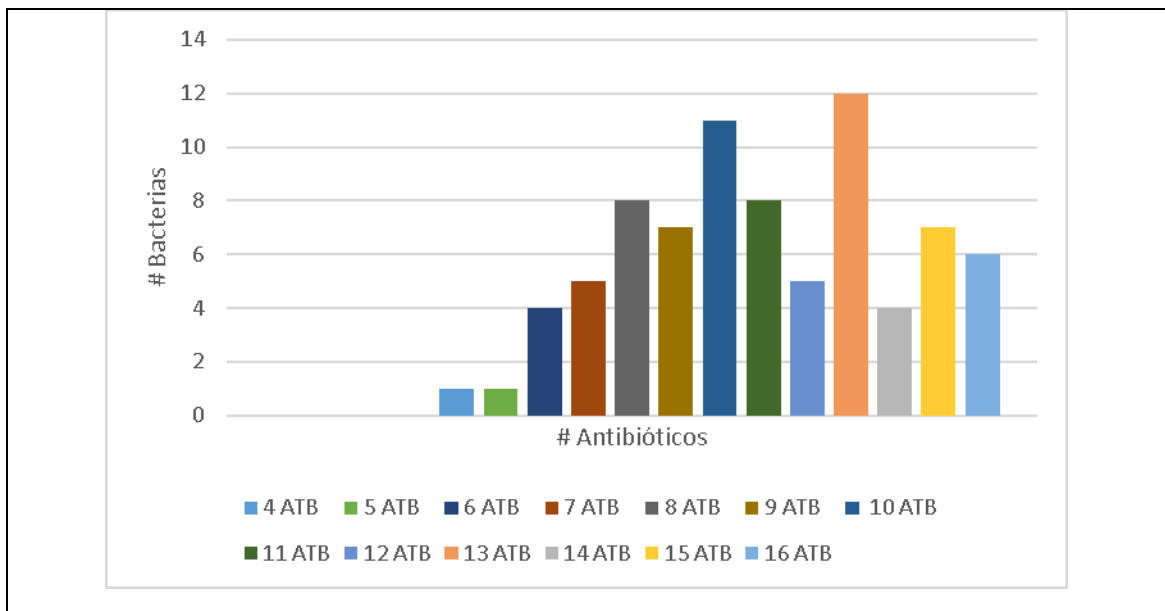
**Fuente.** (Autor, 2020)

#### **Bacterias resistentes a antimicrobianos.**

La resistencia antimicrobiana obtenida de los 79 aislados de *E. coli* en el estudio, fueron evaluadas por 21 antibióticos, clasificadas por familias como: Aminoglucósidos, Betalactámicos, Carbapenem, Cefalosporinas, Fluoroquinolonas, Quinolonas, Macrólidos, Polimixinas, Sulfonamidas potenciadas y Glucopéptidos, mismos que bajo

las normativas del CLSI, estandariza los diámetros de los halos de inhibición; obteniendo la siguiente información: 12/79 cepas de *E. coli* presenta resistencia a 13 antibióticos evaluados; así mismo, 11/79 cepas mantienen una resistencia a 10 fármacos. Un total de 8/79 bacterias aisladas son resistentes a 8 antibióticos; mientras, la misma cantidad de cepas lo es para 7 antimicrobianos, 7/79 de estos microorganismos presenta resistencia a 9 antibióticos, 5/79 cepas son resistentes para 7 antibióticos, así mismo 5/79 lo son para 12 antibióticos diferentes.

**Figura 2. Cepas bacterianas frente al panel de antibióticos**



**Fuente:** (Autor, 2020)

Además, la investigación describe 4/79 cepas resistentes a 14 medicamentos, también el estudio otorga datos que aseveran que 2/79 cepas de *E. coli* son resistentes a 4 y 5 antibióticos respectivamente, descrito en la figura 2. La resistencia microbiana en la comunidad, y las considerables variaciones geográficas y temporales que presentan los perfiles de resistencia, ha elevado el interés en la realización de estudios de multiresistencia bacteriana en *E. coli* (Carvalho et al., 2016).

### Identificación de Bacterias con fenotipo BLEE

Con la finalidad de detectar BLEE, se emplearon inhibidores de estas enzimas, como el ácido clavulánico que en combinación con cefalosporinas de tercera y cuarta generación inhiben a las BLEE y reduce el nivel de resistencia de estas a las cefalosporinas. Para la interpretación y la lectura, se precedió por los resultados obtenidos en base a una zona de inhibición agrandada o distorsionada alrededor del disco de Amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) como indicativo de sinergia entre antibióticos como: Cefepime (FEP), Ceftazidima (CAZ) y Ceftriaxona (CRO), la cual se tomó como evidencia de un resultado positivo para un fenotipo BLEE (Ghimire et al., 2017). Un total de 57/79 aislados mostraron la sensibilidad frente a estos inhibidores para las cefalosporinas en la zona cercana al disco que contenía esta mezcla; de los cuales 15 (26.3%) pertenecen a perros callejeros y 42 (73.7%) a perros tratados en centros veterinarios, expuestos en la tabla 5 y 6.

**Tabla 5. Identificación de cepas con fenotipo BLEE Y AmpC**

/	CALLEJEROS	DOMÉSTICOS	# CEPAS +	% CEPAS +	# CEPAS -	% CEPAS -	TOTAL CEPAS
<b>BLEE</b>	15	42	57	72,2	22	27,8	79
<b>AmpC</b>	18	46	64	81,0	15	19,0	79

**Fuente:** (Autor, 2020)

### Identificación de Bacterias con fenotipo AmpC

Entre otros mecanismos de resistencia a betalactámicos estudiados, se incluyó la interpretación de pruebas fenotípicas para evaluar los efectos producidos por los inhibidores de AmpC; misma que trata de caracterizar enzimas de resistencia a la combinación de betalactámico con inhibidores de betalactamasas, con la excepción de piperacilina-tazobactam. Para la técnica se incluyó un antimicrobiano inductor como lo es: Imipenem (IMI) y un antibiótico revelador o testigo como: Ceftazidima (CAZ) y Piperacilina-tazobactam (TZP), cuya sinergia de inhibición fue detectada en 64/79 cepas



bacterianas de *E. coli* estudiadas, de los cuales 18 (28.1%) pertenecen a perros callejeros y 46 (71.9%) a perros tratados en centros veterinarios, descrito en la tabla 5 y 6.

**Tabla 6. Codificación de cepas de Escherichia coli positivas a BLEE y AmpC**

#	CEPA	ORIGEN	BLEE	AmpC
E1	CVSP02b1	Doméstico CVSP	NO	NO
E2	CVSP04a	Doméstico CVSP	NO	SI
E3	CVSP05a	Doméstico CVSP	NO	NO
E4	CVSP08a	Doméstico CVSP	NO	SI
E5	CVSP12Sa	Doméstico CVSP	SI	SI
E6	CVSP15Sa	Doméstico CVSP	SI	SI
E7	CVSP17Sa	Doméstico CVSP	SI	SI
E8	CVSP18Ea	Doméstico CVSP	SI	SI
E9	CVSP26Sa	Doméstico CVSP	SI	SI
E10	C2a	Callejero	SI	SI
E11	C14a	Callejero	SI	SI
E12	CVSP35E1	Doméstico CVSP	SI	SI
E13	CVSP37E1	Doméstico CVSP	SI	SI
E14	CVSP39S	Doméstico CVSP	SI	SI
E15	CVSP43S1	Doméstico CVSP	SI	SI
E16	CVSP45E1a	Doméstico CVSP	NO	SI
E17	CVSP47E1	Doméstico CVSP	SI	SI
E18	CVSP48E1	Doméstico CVSP	NO	SI
E19	C17a	Callejero	SI	SI
E20	CVSP49a	Doméstico CVSP	SI	SI
E21	CVSP52a	Doméstico CVSP	SI	SI
E22	CVSP57a	Doméstico CVSP	SI	SI
E23	C37	Callejero	NO	NO
E24	C19a	Callejero	SI	SI
E25	C20a	Callejero	NO	NO
E26	C29a	Callejero	SI	SI
E27	C30a	Callejero	SI	SI
E28	CVSP60a	Doméstico CVSP	SI	SI
E29	CVSP61a	Doméstico CVSP	SI	SI
E30	CVSP62a	Doméstico CVSP	SI	NO
E31	CVSP68a	Doméstico CVSP	SI	NO
E32	CVSP69a	Doméstico CVSP	NO	NO
E33	CVSP73a	Doméstico CVSP	SI	SI
E34	CVSP76a	Doméstico CVSP	SI	SI

#	CEPA	ORIGEN	BLEE	AmpC
E35	CVSP77a	Doméstico CVSP	SI	SI
E36	C18a	Callejero	SI	SI
E37	CVSP79a	Doméstico CVSP	SI	SI
E38	CVPP02a	Doméstico CVPP	NO	NO
E39	CVPP03a	Doméstico CVPP	NO	SI
E40	CVPP04a	Doméstico CVPP	NO	SI
E41	CVPP05a	Doméstico CVPP	SI	NO
E42	CVPP06	Doméstico CVPP	SI	SI
E43	CVPP07a1	Doméstico CVPP	SI	SI
E44	CVPP08	Doméstico CVPP	NO	SI
E45	CVSP81a	Doméstico CVSP	SI	SI
E46	CVSP83a	Doméstico CVSP	NO	SI
E47	C36	Callejero	NO	NO
E48	CVSP84	Doméstico CVSP	SI	NO
E49	CVSP85	Doméstico CVSP	SI	SI
E50	CVSP89	Doméstico CVSP	SI	NO
E51	CVSP93	Doméstico CVSP	SI	SI
E52	CVSP94	Doméstico CVSP	SI	SI
E53	CVSP98a	Doméstico CVSP	NO	NO
E54	CVPP12a	Doméstico CVPP	SI	SI
E55	CVSP100a	Doméstico CVSP	NO	SI
E56	C2c	Callejero	SI	SI
E57	CVSP99	Doméstico CVSP	SI	SI
E58	C20b	Callejero	NO	NO
E59	CVSP60b	Doméstico CVSP	SI	SI
E60	C19b	Callejero	SI	SI
E61	C29b	Callejero	SI	SI
E62	C17b	Callejero	SI	SI
E63	C30b	Callejero	SI	SI
E64	C36b	Callejero	NO	SI
E65	C37b	Callejero	NO	SI
E66	CVPP07c	Doméstico CVPP	SI	SI
E67	C18b	Callejero	SI	SI
E68	C18a	Callejero	SI	SI
E69	CVSP73b	Doméstico CVSP	SI	SI
E70	CVSP68b	Doméstico CVSP	SI	SI
E71	CVSP57b	Doméstico CVSP	SI	SI
E72	CVSP62b	Doméstico CVSP	SI	SI
E73	C2b	Callejero	SI	SI
E74	CVSP45E2	Doméstico CVSP	SI	SI
E75	CVSP45E3	Doméstico CVSP	SI	SI
E76	C14b	Callejero	SI	SI

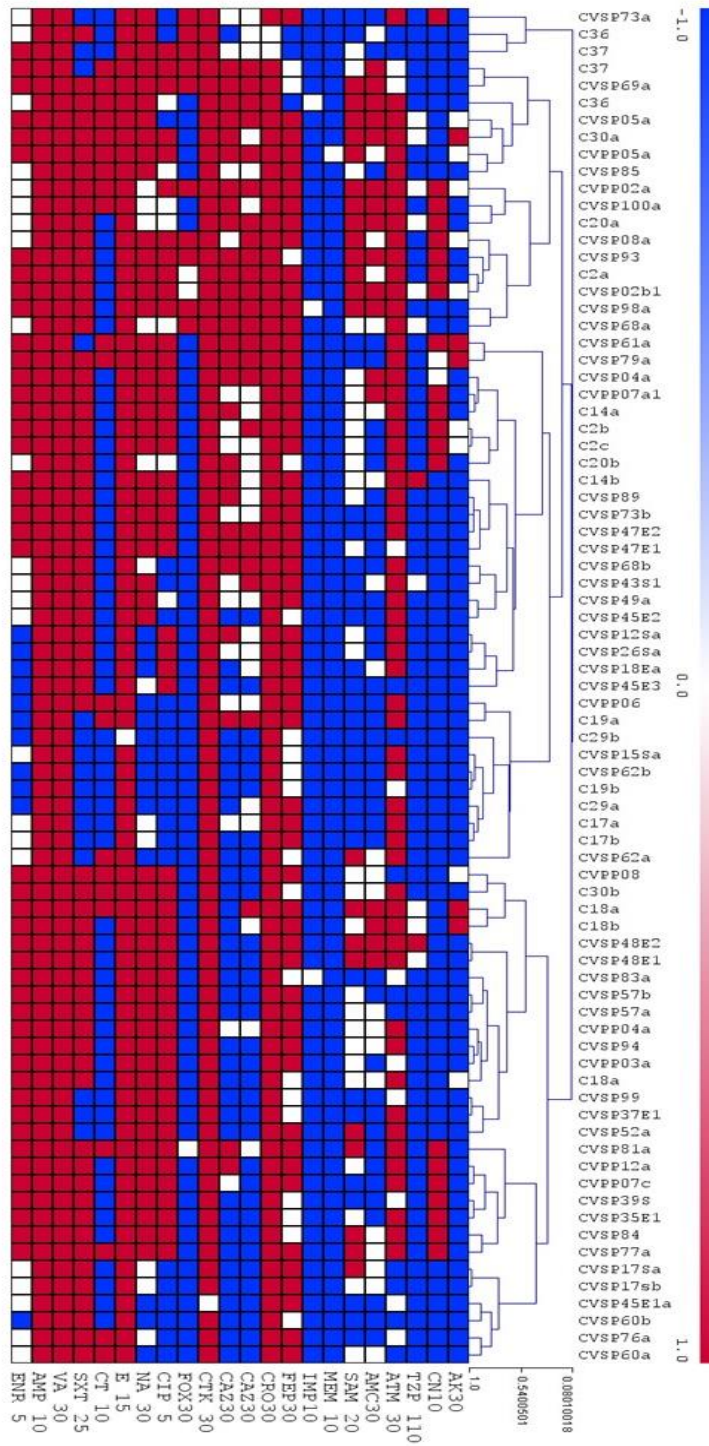
#	CEPA	ORIGEN	BLEE	AmpC
E77	CVSP48E2	Doméstico CVSP	NO	NO
E78	CVSP47E2	Doméstico CVSP	SI	SI
E79	CVSP17Sb	Doméstico CVSP	NO	SI
<b>Fuente:</b> (Autor, 2020)				

### **Agrupamiento Jerárquico de los Patrones de Susceptibilidad**

El perfil de resistencia para cada aislado de *E. coli*. utilizó un análisis jerárquico de conglomerados/clúster, descrito en la (Figura 3 y 4), mismo que permitió visualizar las semejanzas de los resultados de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana, en cuyo análisis y agrupación se llevó a cabo utilizando el software MeV.

Las cepas de *E. coli*, se separó en grupos según su perfil de susceptibilidad al panel determinado de antibióticos testados, factores que permitieron tener una clasificación mediante un árbol de análisis jerárquico; dando como resultado 9 clúster diferentes. Tabla 5. Resultados que están aglomerados por ciertas características como: muestras fecales de centros clínicos veterinarios “CVSP Y CVPP” y muestras de perros callejeros “C”, cuyas semejanzas se basó en multiresistencia, sensibilidad, susceptibilidad y procedencia.

Figura 3. Árbol de análisis jerárquico

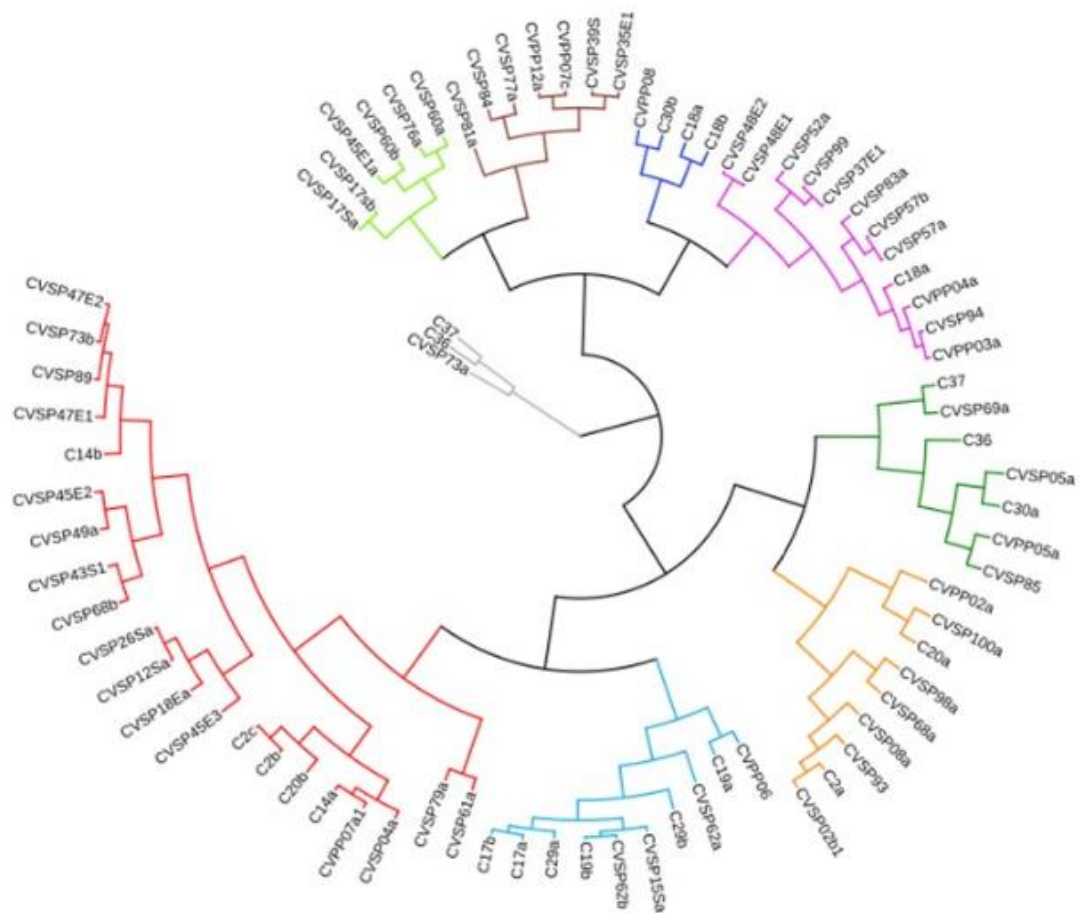


(Fuente: (Autor, 2020))

La diversidad clonal de los genes de resistencia a betalactámicos en aislados de *E. coli*, se muestra en la tabla 6, donde encontramos un dendograma que se adquirió mediante el uso del programa Itol, cuya similitud entre cepas fue analizado por medio del índice de Dice, por el Método de Pares no Ponderados utilizando una Media Aritmética (UPGMA).

La diversidad clonal presente entre las cepas analizadas, es demostrada en la figura 3; donde se consideró una similitud mayor o igual a un 80% para agrupar las cepas en un mismo clon o clúster; la misma imagen menciona un total de 9 clúster.

**Figura 4. Dendograma de las pruebas de susceptibilidad**



**Fuente: (Autor, 2020)**

Además, se puede visualizar la relación fenotípica de los grupos clonales (C2, C3, C4 y C5) con características de un ancestro en común, así con el grupo (C6, C7, C8 y C9), que comparte similitudes a un mismo patrón fenotípico. El grupo clonal C1 presenta: 3 aislamientos con un solo subtipo, 2 de origen callejero y uno de origen doméstico CVSP; mientras el clúster C2 presenta 6 aislamientos con 3 subtipos, que corresponden al mismo origen doméstico CVSP; por otra parte, el clúster C3 manifiesta 7 aislados con 4 subtipos; 71,4% y 28.6% de origen domestico CVSP y CVPP respectivamente.

Los grupos C4 revela 4 aislamientos con 2 subtipos de los cuales se estiman, que un 75% son de origen callejero y un 25% de origen doméstico CVPP; en cuanto al clúster C5 mantuvo 12 aislamientos con 6 subtipos que corresponden a orígenes variados CVSP y CVPP y callejeros. En los aglomerados C6 y C7 se visualiza 4 aislamientos con 4 subtipos, y 9 aislamientos con 5 subtipos respectivamente; mismo que presentan una variación entre los aislamientos: callejeros y domésticos CVSP Y CVPP. En cuanto al conjunto C8 posee 10 aislamientos con 6 subtipos, el 60% de origen callejero y el 40% de origen doméstico CVSP Y CVPP; por último, el clúster C9 tiene 21 aislamientos con 8 subtipos, 76,2% de origen doméstico CVSP Y CVPP y 23,8% en callejeros.

### 3.2. Discusión

El aparecimiento y continua evolución de cepas bacterianas multirresistentes se ha convertido en un problema de índole mundial, tanto en medicina veterinaria como en el tratamiento de infecciones en humanos (**Castañeda et al., 2016**). Una de las prioridades médicas en la actualidad es la creciente resistencia antimicrobiana a betalactámicos, detectada en muestras fecales de animales de compañía, hecho que resulta alarmante en la práctica diaria, puesto que es uno de los grupos antimicrobianos en primera línea de utilización en el tratamiento médico clínico de infecciones.

Por esas razones, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) promueven el monitoreo de microorganismos multidrogosresistentes entre los que destaca *E. coli*; por tal motivo esta investigación evaluó la afectación de *E. coli* en muestras de origen en caninos de una misma zona geográfica Ambato-Ecuador, encontrando perfiles de resistencia para: Ampicilina (100%), Vancomicina (100%), Cefotaxima (98.7%), Eritromicina (98.7%), ceftriaxona (97.5%), Sulfametoxazol/Trimetropin (79.7%), Aztreonam (73.4%), Cefepime (72.2%), Ciprofloxacina (63.3%) y Enrofloxacina 57%; cuya resistencia a estos antimicrobianos puede atribuirse al uso indiscriminado, empírico y autodosificado de estos medicamentos, careciendo en primera instancia de un diagnóstico de laboratorio, como de la aplicación negligente de los mismos (**López-Velandia et al., 2015**).

El 72.2% de cepas positivas analizadas, presentan un fenotipo de resistencia compatible a BLEE, de las cuales 26.3% pertenecen a caninos callejeros y 73.7% a caninos tratados en centros veterinarios; datos que son ligeramente superiores a los reportados por **Espinoza, E. (2017)**, en Quito-Ecuador en perros valorados en una clínica veterinaria, donde obtuvieron un 87.64% de BLEE. Por su parte, en su estudio realizado en parques públicos de Copenhague-Dinamarca obtuvo una prevalencia de 1.9%, diferente a los encontrado en Corea del Sur, quienes muestran un 25.5% (**Tamang et al., 2012**).

Con mayor porcentaje esta investigación informó un 81% de resistencia compatible con betalactamasas tipo AmpC de los cuales 28.1% pertenecen a perros callejeros y 71.9% a perros tratados en centros veterinarios; resultados que discrepan con los detectados en Alemania quienes reportaron un 4% en caninos hospitalizados (**Schaufler et al., 2015**) similitud de datos fueron reportados en Portugal quienes obtuvieron un 20% de cepas *E. coli* aislada en perros callejeros (**Belas et al., 2014**).

La totalidad de las cepas de *E. coli* analizadas, se encuentran resistentes para Ampicilina y Vancomicina, perfiles similares fueron encontrados en Ampicilina 100% (54/54) en Taiwán (**Huang et al., 2020**); mientras Abbas et al., (2019) sostuvo en Pakistán una resistencia al mismo fármaco en un 80.8% (84/105) en heces fecales de caninos. Por su parte el uso de la Vancomicina está relacionado a infecciones no responsivas o con sensibilidad reducida a penicilinas o cefalosporinas, hecho que nos lleva a considerar el uso inapropiado y la falta de datos sobre el antibiótico por la clínica práctica (**López-Velandia et al., 2015**).

Las cepas estudiadas exhiben resistencia a Cefotaxima 98.7%, Eritromicina 98.7% y Ceftriaxona 97.5%; sin embargo (Aslantaş & Yilmaz, 2017) obtiene en sus aislamientos una resistencia para la Cefotaxima de un 22% (95/428) y 45.3% (194/428) para Eritromicina; mientras **Espinoza, (2017)** presencié una sensibilidad para la Ceftriaxona de un 32.9% (89/270) llevando a considerar, que la producción de betalactamasas de espectro extendido es una amenaza latente de la eficacia de cefalosporinas ya administradas en el sector veterinario en procedimientos críticos. De los antibióticos analizados, se presencia una mayor sensibilidad al Imipenem, Meropenem y Amikacina, en cuyo grupo los Carbapenémicos se ponderan efectivos contra las bacterias productoras de BLEE, datos que son sustentados con nuestros resultados por (**Ghimire & , Bipesh Acharya, 2017**). No obstante, el uso de estos fármacos en animales de compañía, ya reportan resistencia (**Huang et al., 2020**).



El desarrollo de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos no es un fenómeno inesperado ni nuevo; sin embargo, es una situación problemática debido a la frecuencia con la que nuevos fenotipos de resistencia emergentes ocurren (**OIE, 2008**). La presión selectiva ejercida por factores externos, como el mal uso, venta libre y falta de suficientes normas regulatorias del uso de antibióticos en medicina humana, veterinaria o agricultura, junto a los diversos mecanismos de resistencia y transferencia genética que poseen las bacterias, contribuyen considerablemente a esta situación.

## CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES

### 4.1. CONCLUSIONES

Se determinó los perfiles fenotípicos de 79 aislados de *Escherichia coli*, tomadas de muestras procedentes de hisopado rectal/fecal de caninos procedentes de la ciudad de Ambato, distribuidos en dos grupos: perros callejeros y perros atendidos en centros veterinarios, detectando niveles de multirresistencia en la mayoría de aislados analizados.

La evaluación de los perfiles de resistencia y sensibilidad antibiótica en los 79 aislados de *E. coli*, mostraron resistencia para Ampicilina 100% (79/79), Vancomicina 100% (79/79), Cefotaxima 98.7% (78/79), Eritromicina 98.7% (78/79) y Ceftriaxona 97.5% (77/79); y mostraron una mayor sensibilidad frente a antibióticos como: Meropenem 98.7% (78/79), Imipenem 96.2% (76/79). Estos resultados sugieren que los animales de compañía pueden representar potenciales reservorios de microorganismos resistentes y ponen en evidencia la necesidad de realizar diagnósticos basados en cultivo para prescribir antibióticos.

La identificación de perfiles fenotípicos por el método ESBL; (Espectro extendido de Betalactamasas), detectó un total de 57/79 aislados positivo; de los cuales 15 (26.3%) pertenecen a perros callejeros y 42 (73.7%) a perros tratados en centros veterinarios. Se identificó los perfiles fenotípicos en *E. coli* con resistencia antimicrobiana por el método AmpC; (Serin-Betalactamasa), en cuya correlación de inhibición se detectó 64/79 cepas bacterianas, de las cuales 18 (28.1%) proceden de caninos callejeros y 46 (71.9%) de caninos tratados en centros veterinarios.

La presencia de microorganismos multirresistentes en caninos es preocupante, considerando que las mascotas pueden representar un reservorio silencioso de estos patógenos. Se detectó una mayor frecuencia de aislamientos resistentes en animales con dueño en comparación con los animales callejeros, por lo que se sugiere que las interacciones entre mascotas y propietarios, los hábitos de alimentación y el entorno tienden a favorecer la selección de estos patógenos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, Ghazanfar, Iahtasham Khan, Mashkoor Mohsin, Sajjad-ur-Rahman, Tayyaba Younas & Shahzad Ali. 2019. “High rates of CTX-M group-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamases producing escherichia coli from pets and their owners in Faisalabad, Pakistan.” *Dove Medical Press Journal* 12:571–78.
- Aslantaş, Özcan & Ebru Şebnem Yilmaz. 2017. “Prevalence and molecular characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) and plasmidic AmpC  $\beta$ -lactamase (pAmpC) producing Escherichia coli in dogs.” *Journal of Veterinary Medical Science*, 79(6):1024–30.
- Belas, Adriana, A-S. Salazar, L-T. Gama, N. Couto & C. Pomba. 2014. “Risk factors for faecal colonisation with *Escherichia coli* producing extended-spectrum and plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in dogs.” *Veterinary Record*, 175(8):202.
- Boehmer, Tim, Amy Vogler, Astrid Thomas, Sabine Sauer, Markus Hergenroether, Reinhard Straubinger, Dawn Birdsell, Paul Keim, Jason Sahl, Charles Williamson & Julia Riehm. 2018. “Phenotypic characterization and whole genome analysis of extended-spectrum betalactamase-producing bacteria isolated from dogs in Germany.” *Plos one* 13(10).
- Canton, Rafael, Alba Gonzalez & Juan-Carlos Galan. 2012. “CTX-M enzymes: Origin and diffusion.” *Frontiers in Microbiology*, 3(2).
- Carvalho, A. C., Barbosa, A. V., Arais, L. R., Ribeiro, P. F., Carneiro, V. C., & Cerqueira, A. M. F. 2016. “Resistance patterns, ESBL genes, and genetic relatedness of Escherichia coli from dogs and owners.” *Brazilian Journal of Microbiology* 47(1):150–158.
- Castañeda, Jeimmy, Karen Gómez, Lucia Corrales & Sebastian Cortés. 2016. “Perfil de resistencia a antibióticos en bacterias que presentan la enzima NDM-1 y sus

- mecanismos asociados.” re. *Nova* 13(25):95–111.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2020. “Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (M100).” 30:32-42.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. “Performance Standards for Antimicrobial Wayne (M100-S25).” 521-29.
- Damborg, Peter, Malene-Kjelin Morsing, Tanja Petersen, Valeria Bortolaia & Luca Guardabassi. 2015. “CTX-M-1 and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* in dog faeces from public gardens.” *Acta Veterinaria Scandinavica* 57(1): 1–4.
- Drawz, Sara & Robert Bonomo. 2010. “Three decades of B-lactamase inhibitors.” *Clinical Microbiology Reviews* 23(1):160–201.
- Espinoza Alberca, Eunice Elizabeth. 2017. “AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE *Escherichia coli* RESISTENTES A BETALACTÁMICOS DE ESPECTRO EXTENDIDO MEDIANTE AISLAMIENTO BACTERIANO DE CANINOS EN LA ZONA URBANA DE QUITO.” Universidad Central de Ecuador.
- Ghimire, Albert, Bipesh Acharya & Reshma Tuladar. 2017. “Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL) Producing Multidrug Resistant Gram-Negative Bacteria from Various Clinical Specimens of Patients Visiting a Tertiary Care Hospital.” *Tribhuvan University Journal of Microbiology* 4(1).
- Hordijk, Joost, Anky Schoormans, Mandy Kwakernaak, Birgitta Duim, Els Broens, Cindy Dierikx, Dik Mevius & Jack Wagenaar. 2013. “High prevalence of fecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase/AmpC-producing Enterobacteriaceae in cats and dogs.” *Frontiers in Microbiology* 4(1):1–5.
- Huanca, F. 2014. “Prevalencia de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro ampliado (BLEE) en urocultivos y coprocultivos de pacientes Hospital Eduardo. *Ecorfan.Org* 315–338.
- Huang, Yi-Hsuan, Nan Kuan & Kuang Yeh. 2020. “Characteristics of Extended-

- Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* From Dogs and Cats Admitted to a Veterinary Teaching Hospital in Taipei, Taiwan From 2014 to 2017.” *Frontiers in Veterinary Science* 7(1):1–9.
- Hughes, Diarmaid. 2014. “Selection and evolution of resistance to antimicrobial drugs.” *IUBMB Life* 521–529.
- INAMHI. 2014. *Anuario Meteorológico. Nro 51-2011*. Vol. 51.
- Karkaba, Ali, Alejandro Grinberg, Jackie Benschop & Eve Pleydell. 2017. “Characterisation of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and AmpC  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolated from companion animals in New Zealand.” *New Zealand Veterinary Journal* 65(2):105–12.
- Lee, Yangsoon, Chang-Ki Kim, Hae-Sun Chung, Dongeun Yong, Seokhoon Jeong, Kyungwon Lee & Yunsop Chong. 2015. “Increasing carbapenem-resistant gram-negative bacilli and decreasing metallo- $\beta$ -lactamase producers over eight years from Korea.” *Yonsei Medical Journal* 56(2):572–577.
- Ljungquist, Oscar, Ditte Ljungquist, Matyas Myrenås, Cecilia Rydén, Maria Finn & Bjorn Bengtsson. 2016. “Evidence of household transfer of ESBL-/pAmpC-producing Enterobacteriaceae between humans and dogs – a pilot study.” *Infection Ecology & Epidemiology* 6(1).
- López-Velandia, Diana, Maria Torres-Caycedo, & Carlos Prada-Quiroga. 2015. “Genes de resistencia en bacilos Gram negativos: Impacto en la salud pública en Colombia” *Revista Universidad y Salud* 18(1):190–202.
- Marston, Hilary, Dennise Dixon, Jara Knisely, Tara Palmore & Anthony Fauci. 2016. “Antimicrobial Resistance” *Journal of the American Medical Association*.
- Mendelson, Marc, Adrian Brink, Johannes Gouws, Nontombi Mbelle, Vinny Naidoo, Troy Pople, Natalie Schellack, Moritz Van-Vuuren, Helen Rees, Shabir Banoo, Khotso Bokaba, Marius Collins, Kim Faure, Marike Herbst, Beyers Hoek, Ruth Lancaster, Jeannette Lotter, Mike Modisane, Mahlodi Mohlala, ... Gerry Swan

2018. “The One Health stewardship of colistin as an antibiotic of last resort for human health in South Africa.” *The Lancet Infectious Diseases* 18(9):288–94.
- Miranda García, M. C. 2013. “*Escherichia coli* portador de betalactamasas de espectro extendido; Resistencia.” *Sanidad Militar* 69(4):244–48.
- Monterroso, Michelle, Guillermo Salvatierra, André Sedano & Sonia Calle. 2019. “Phenotypic detection of antimicrobial resistance mechanisms of *Escherichia coli* isolates from enteric infections in pigs from technified farms.” *Rev. Inv. Vet.* (Perú).
- Navarro, Ferran, Jorge Calvo, Rafael Cantón, Felipe Fernández-Cuenca & Beatriz Mirelis. 2011. “Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos.” *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 29(7):524–34.
- Ortega-Paredes, David, Pedro Barba & Jeannette Zurita. 2016. “Colistin-resistant *Escherichia coli* clinical isolate harbouring the mcr-1 gene in Ecuador.” *Epidemiology and Infection* 1–4.
- Sánchez-Salazar, Elizabeth, Marco Gudiño, Gabriela Sevillano, Jeannette Zurita, Ricardo Guerrero-López, Katherine Jaramillo & Wiliam Calero-Cáceres. 2019. “Antibiotic resistance of *Salmonella* strains from layer poultry farms in central Ecuador.” *Journal of Applied Microbiology* 1–8.
- Schaufler, Karina, Astrid Bethe, Antina Lübke-Becker, Cristina Ewers, Barbara Kohn, Lothar Wieler & Sebastian Guenther. 2015. “Putative connection between zoonotic multiresistant extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in dog feces from a veterinary campus and clinical isolates from dogs.” *African Journal of Disability* 5(1):10–14.
- Shaikh, Sibghatulla, Jamale Fatima, Shazi Shakil, Syed Rizvi & Mohammad Kamal. 2015. “Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment.” *Saudi Journal of Biological Sciences* 22(1):90–101.
- So, Jeon, Juwon Kim, Il Kwon Bae, Seok Jeong, So Kim, Sik Lim, Yong Park &

- Kyungwon Lee. 2012. "Dissemination of multidrug-resistant *Escherichia coli* in Korean veterinary hospitals." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 73(2):195–99.
- Sun, Jian, Huimin Zhang, Ya-Hong Liu & Youjun Feng. 2018. "Towards Understanding MCR-like Colistin Resistance." *Trends in Microbiology* 26(9): 794–808.
- Tamang, Migma, Hyang Nam, Geum Jang, Su Kim, Myung Chae, Suk Jung, Jae Byun, Yong Park & Suk-Kyung Lim. 2012. "Molecular characterization of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing and plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from stray dogs in South Korea." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56(5): 2705–12.
- Van Puyvelde, Sandra, Stijn Deborggraeve & Jan Jacobs. 2018. "Why the antibiotic resistance crisis requires a One Health approach." *The Lancet-Infectious diseases* 18(2):132–34.
- Vinueza-Burgos, Christian, Maria Baquero, Jose Medina & Lieven De Zutter. 2019. "Occurrence, genotypes and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* collected from the broiler production chain within an integrated poultry company." *International Journal of Food Microbiology* 299: 1–7.
- Xia, Shu, Xin Fan, Zengguang Huang, Liang Xia, Meng Xiao, Rongchang Chen, Yingchun Xu & Chao Zhuo. 2014. "Dominance of CTX-M-type Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from patients with community-onset and hospital-onset infection in China." *Plos-one* 9(7)
- Zotta, Claudio, Silvina Lavayen, Patricia Hollmann & Viviana Lanfranconi. 2015. "Pets as Reservoir *Escherichia coli* Shiga Toxin-Producer in Mar del Plata Animales domésticos como reservorio de *Escherichia coli* Productor de Toxina Shiga en Mar del Plata." *Journal of the Selva Andina Research Society* 6(1):2–9.



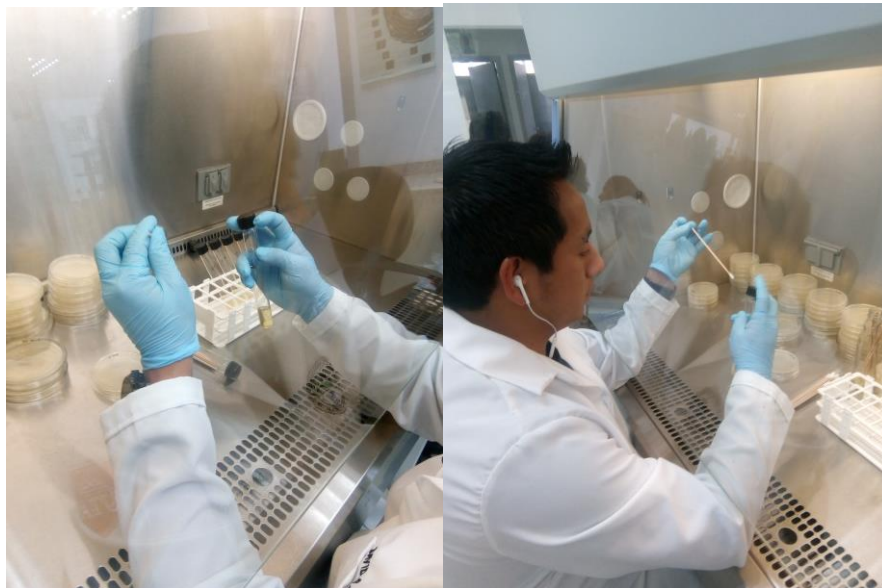
## ANEXOS

### ANEXO A

#### Fotografías



**Foto 1. Preparación de la biomasa e inoculación de la bacteria.**



**Fotos 2. Siembra de la bacteria en el Agar Müller-Hinton.**



**Foto 3. Incubación de la bacteria *over night*.**



**Foto 4. Lectura e interpretación de fenotipos BLEE y AmpC.**

## ANEXO B

### Banco de cepas de origen canino de la ciudad de Ambato

CODIGO	CEPA	ORIGEN	EDAD	RAZA	SEXO	ANAMNESIS
E1	CVSP02b1	Doméstico CVSP	7 años	Basset Hound	H	GTX
E2	CVSP04a	Doméstico CVSP	3 meses	Husky	H	GTX
E3	CVSP05a	Doméstico CVSP	3 años	Shitzu	M	GTX
E4	CVSP08a	Doméstico CVSP	2 años	Shitzu	H	GTX
E5	CVSP12Sa	Doméstico CVSP	9 años	Doberman pinscher	M	S
E6	CVSP15Sa	Doméstico CVSP	4 meses	Pit Bull	M	S
E7	CVSP17Sa	Doméstico CVSP	1 año	Shitzu	M	S
E8	CVSP18Ea	Doméstico CVSP	2 años	Bull Dog Ingles	M	GTX
E9	CVSP26Sa	Doméstico CVSP	2 años	Pastor Aleman	H	S
E10	C2a	Callejero	2 años	Mestizo	M	HAB
E11	C14a	Callejero	3 años	Mestizo	M	S
E12	CVSP35E1	Doméstico CVSP	1 mes	Shitzu	M	GTX
E13	CVSP37E1	Doméstico CVSP	3 meses	Pit Bull	M	GTX
E14	CVSP39S	Doméstico CVSP	2 años	Poodle	H	S
E15	CVSP43S1	Doméstico CVSP	2 meses	Poodle	H	S
E16	CVSP45E1a	Doméstico CVSP	1 mes	Sharpei	M	PVS
E17	CVSP47E1	Doméstico CVSP	9 años	Poodle	M	GTX
E18	CVSP48E1	Doméstico CVSP	12 años	Poodle	M	TBR
E19	C17a	Callejero	8 meses	Pit Bull	M	VIN
E20	CVSP49a	Doméstico CVSP	3 años	Mestizo	M	GTX
E21	CVSP52a	Doméstico CVSP	14 años	Labrador	M	OSA
E22	CVSP57a	Doméstico CVSP	3 años	Mestizo	M	TBR
E23	C37	Callejero	5 años	Mestizo	M	S
E24	C19a	Callejero	2 años	Mestizo	H	S
E25	C20a	Callejero	16 años	Mestizo	H	S
E26	C29a	Callejero	7 años	Mestizo	H	S
E27	C30a	Callejero	9 años	Mestizo	H	S
E28	CVSP60a	Doméstico CVSP	9 años	Sharpei	M	DER
E29	CVSP61a	Doméstico CVSP	6 meses	Schnautzer	H	PVR
E30	CVSP62a	Doméstico CVSP	4 meses	Pekinés	H	S
E31	CVSP68a	Doméstico CVSP	15 años	Poodle	M	ORQ
E32	CVSP69a	Doméstico CVSP	2 años	Doberman	M	S

E33	CVSP73a	Doméstico CVSP	10 años	Poodle	H	OSA
E34	CVSP76a	Doméstico CVSP	2 años	Yorkshire	H	S
E35	CVSP77a	Doméstico CVSP	8 años	Mestizo	M	S
E36	C18a	Callejero	2 años	Mestizo	H	S
E37	CVSP79a	Doméstico CVSP	4 meses	Mestizo	H	S
E38	CVPP02a	Doméstico CVPP	6 años	Schnautzer	H	OSA
E39	CVPP03a	Doméstico CVPP	3 meses	Poodle	H	S
E40	CVPP04a	Doméstico CVPP	8 años	Mestizo	H	DER
E41	CVPP05a	Doméstico CVPP	6 meses	Cocker Spaniel	H	DIS
E42	CVPP06	Doméstico CVPP	3 años	Mestizo	H	S
E43	CVPP07a1	Doméstico CVPP	5 meses	Poodle	M	DIS
E44	CVPP08	Doméstico CVPP	14 años	Golden Retriever	M	NEU
E45	CVSP81a	Doméstico CVSP	3 meses	Pit Bull	M	PVS
E46	CVSP83a	Doméstico CVSP	10 años	Poodle	M	TBR
E47	C36	Callejero	4 años	Mestizo	M	S
E48	CVSP84	Doméstico CVSP	4 meses	Mestizo	M	S
E49	CVSP85	Doméstico CVSP	3 años	Teckel	M	PTM
E50	CVSP89	Doméstico CVSP	1 año	Boxer	H	GTX
E51	CVSP93	Doméstico CVSP	2 meses	Poodle	M	GTX
E52	CVSP94	Doméstico CVSP	3 años	Pit Bull	H	GES
E53	CVSP98a	Doméstico CVSP	2 meses	Bull Terrier	H	GTX
E54	CVPP12a	Doméstico CVPP	3 años	Schnautzer	M	ITX
E55	CVSP100a	Doméstico CVSP	10 años	Poodle	H	NPL
E56	C2c	Callejero	2 años	Mestizo	M	HAB
E57	CVSP99	Doméstico CVSP	2 meses	Bull Terrier	M	GTX
E58	C20b	Callejero	16 años	Mestizo	H	S
E59	CVSP60b	Doméstico CVSP	9 años	Sharpei	M	DER
E60	C19b	Callejero	2 años	Mestizo	H	S
E61	C29b	Callejero	7 años	Mestizo	H	S
E62	C17b	Callejero	8 meses	Pitbull	M	VIN
E63	C30b	Callejero	9 años	Mestizo	H	S
E64	C36b	Callejero	4 años	Mestizo	M	S
E65	C37b	Callejero	5 años	Mestizo	M	S
E66	CVPP07c	Doméstico CVPP	5 meses	Poodle	M	DIS
E67	C18b	Callejero	2 años	Mestizo	H	S
E68	C18a	Callejero	2 años	Mestizo	H	S
E69	CVSP73b	Doméstico CVSP	10 años	Poodle	H	OSA

E70	CVSP68b	Doméstico CVSP	15 años	Poodle	M	ORQ
E71	CVSP57b	Doméstico CVSP	3 años	Mestizo	M	TBR
E72	CVSP62b	Doméstico CVSP	4 meses	Pekínés	H	S
E73	C2b	Callejero	2 años	Mestizo	M	HAB
E74	CVSP45E2	Doméstico CVSP	1 mes	Sharpei	M	GTX
E75	CVSP45E3	Doméstico CVSP	1 mes	Sharpei	M	GTX
E76	C14b	Callejero	3 años	Mestizo	M	S
E77	CVSP48E2	Doméstico CVSP	12 años	Poodle	M	TBR
E78	CVSP47E2	Doméstico CVSP	9 años	Poodle	M	GTX
E79	CVSP17Sb	Doméstico CVSP	1 año	Shitzu	M	S

**DER: dermatitis; DIS: distemper; HAB: herida abrasiva; ITX: intoxicación; NPL: neoplasias; ORQ: orquiectomía; OSA: osteoartritis; PTM: politraumatizado; S: sano; GES: gestante; TBR: traqueobronquitis; NEU: neumonía; VIN: intususcepción; GTX: gastroenteritis; PVS: parvovirus.**

## **ANEXO C**

### **Halo de Inhibición en las 79 cepas de E. coli**

Abr	S	I	R	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15
Ab	S	I	R	CVSP02b 1	CVSP04a	CVSP05a	CVSP08 a	CVSP12S a	CVSP15Sa	CVSP17Sa	CVSP18E a	CVSP26S a	C2a	C14a	CVSP35E 1	CVSP37E 1	CVSP39 S	CVSP43S1
AK30	>17	15-16	<14	15	20	16	16	19	19	19	18	18	17	18	17	18	18	20
CN10	>15	13-14	<12	6	14	16	6	18	18	17	17	17	6	11	6	16	6	18
TZP 110	>21	18-20	<17	19	23	18	24	23	27	22	24	27	22	24	26	26	27	20
ATM 30	>21	18-20	<17	7	14	11	8	14	16	21	14	14	9	13	15	16	18	13
AMC30	>18	14-17	<13	13	12	12	16	21	19	16	17	20	15	17	21	23	21	16
SAM 20	>15	12-14.	<11	11	13	11	11	14	15	11	16	12	10	14	14	16	18	18
MEM 10	>23	20-22	<19	28	27	27	28	28	28	28	28	27	30	29	29	29	30	29
IMP10	>23	20-22	<19	26	26	24	25	28	28	27	26	29	30	28	29	29	28	29
FEP30	>25	19 - 24	<18	8	15	9	11	18	20	17	17	16	12	16	20	20	21	15
CRO30	>23	20-22	<19	6	6	6	6	13	10	12	8	9	6	10	10	10	11	9
CAZ30	>21	18-20	<17	13	15	11	16	18	25	24	20	18	14	18	26	25	26	17
CAZ30	>21	18-20	<17	12	6	12	18	15	25	24	22	18	15	17	25	25	26	18
CTK 30	>26	23-25	<22	6	9	7	6	10	13	14	9	11	6	10	13	12	13	10
FOX30	>18	15-17	<14	15	23	24	13	22	25	25	25	24	17	25	26	25	26	27
CIP 5	>21	16-20	<15	6	13	21	6	9	23	21	11	7	6	10	13	12	14	22
NA 30	>19	14-18	<13	7	6	6	13	6	20	17	6	6	6	6	6	6	6	6
E 15	>23	14 - 22	<13	6	10	6	10	8	10	6	10	6	6	6	6	9	6	9
CT 10	>11		<10	11	12	10	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
SXT 25	>16	11-15.	<10	8	6	6	6	6	27	6	6	6	6	6	6	18	6	6
VA 30	>17	15 - 16	<14	6	6	6	6	6	6	6	6	7	6	6	6	6	6	6
AMP 10	>17	14-16	<13	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
ENR 5	>23	17 - 22	<16	6	9	6	19	8	22	18	8	6	6	7	7	8	8	20

Ab	S	I	R	E16	E17	E18	E19	E20	E21	E22	E23	E24	E25	E26	E27	E28	E29	E30
Ab	S	I	R	CVSP45E1a	CVSP47E1	CVSP48E1	C17a	CVSP49a	CVSP52a	CVSP57a	C37	C19a	C20a	C29a	C30a	CVSP60a	CVSP61a	CVSP62a
AK30	>17	15-16	<14	19	18	18	19	20	20	19	18	18	18	18	14	17	14	17
CN10	>15	13-14	<12	17	16	16	16	17	17	22	17	16	8	15	15	17	8	16
TZP 110	>21	18-20	<17	23	24	20	26	26	26	22	23	26	20	27	18	23	25	22
ATM 30	>21	18-20	<17	18	19	14	12	13	15	22	19	15	13	16	10	21	11	12
AMC30	>18	14-17	<13	20	19	8	22	19	18	15	6	20	13	20	11	15	19	17
SAM 20	>15	12-14.	<11	15	14	7	15	16	11	14	12	17	10	20	10	12	15	11
MEM 10	>23	20-22	<19	29	29	28	28	32	31	30	27	29	25	27	28	27	25	26
IMP10	>23	20-22	<19	27	28	28	28	29	29	28	25	26	25	28	26	28	26	24
FEP30	>25	19 - 24	<18	18	18	16	15	15	12	15	23	15	14	16	13	16	13	19
CRO30	>23	20-22	<19	12	9	10	9	8	8	15	12	8	7	10	9	13	8	10
CAZ30	>21	18-20	<17	23	17	22	18	18	22	25	7	17	15	20	18	25	15	25
CAZ30	>21	18-20	<17	23	17	23	19	19	22	24	10	17	17	21	17	25	16	21
CTK 30	>26	23-25	<22	24	10	10	9	8	9	15	12	9	8	11	8	15	8	6
FOX30	>18	15-17	<14	25	29	24	25	19	25	25	6	21	23	24	22	25	23	24
CIP 5	>21	16-20	<15	23	9	11	21	20	14	13	12	29	18	23	6	21	10	28
NA 30	>19	14-18	<13	26	6	6	15	6	6	6	6	24	17	24	6	19	6	19
E 15	>23	14 - 22	<13	6	9	6	10	10	11	9	10	9	7	12	6	10	10	9
CT 10	>11		<10	11	11	11	11	12	11	12	10	10	11	11	8	10	8	8
SXT 25	>16	11-15.	<10	6	6	6	22	6	26	6	19	25	6	28	6	6	16	20
VA 30	>17	15 - 16	<14	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
AMP 10	>17	14-16	<13	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
ENR 5	>23	17 - 22	<16	20	6	8	18	21	10	7	6	25	19	24	6	19	6	18



Abr	S	I	R	E31	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	E40	E41	E42	E43	E44	E45
Ab	S	I	R	CVSP68a	CVSP69a	CVSP73a	CVSP76a	CVSP77a	C18a	CVSP79a	CVPP02a	CVPP03a	CVPP04a	CVPP05a	CVPP06	CVPP07a1	CVPP08	CVSP81a
AK30	>17	15-16	<14	17	20	19	17	18	13	11	15	19	18	16	20	19	16	17
CN10	>15	13-14	<12	16	20	9	16	11	15	14	6	16	15	17	17	7	17	6
TZP 110	>21	18-20	<17	20	21	25	25	24	19	25	19	23	25	23	26	23	23	21
ATM 30	>21	18-20	<17	6	18	10	18	14	10	9	9	19	13	13	13	15	21	12
AMC30	>18	14-17	<13	17	6	21	18	16	9	18	6	18	16	14	22	10	15	20
SAM 20	>15	12-14.	<11	13	8	17	15	10	8	15	9	14	14	10	19	13	13	10
MEM 10	>23	20-22	<19	24	27	39	27	27	25	23	24	27	28	22	30	29	25	27
IMP10	>23	20-22	<19	26	25	30	28	26	28	28	23	28	28	26	27	27	24	26
FEP30	>25	19 - 24	<18	17	23	16	15	18	9	10	12	15	12	10	15	14	13	12
CRO30	>23	20-22	<19	10	9	10	10	10	7	6	6	11	6	6	10	9	12	8
CAZ30	>21	18-20	<17	9	13	20	25	25	16	17	15	23	19	17	20	19	22	18
CAZ30	>21	18-20	<17	7	10	19	25	22	21	15	16	23	18	16	20	19	24	15
CTK 30	>26	23-25	<22	6	10	6	12	12	7	6	7	13	7	10	11	10	15	8
FOX30	>18	15-17	<14	6	6	14	24	24	21	19	6	26	22	21	24	22	21	16
CIP 5	>21	16-20	<15	20	12	22	23	12	6	6	14	11	6	6	29	6	6	6
NA 30	>19	14-18	<13	17	6	11	18	6	6	6	15	6	6	6	24	6	6	6
E 15	>23	14 - 22	<13	6	6	6	11	6	6	9	9	6	6	8	10	9	8	9
CT 10	>11		<10	12	9	12	7	9	9	7	10	11	12	6	10	11	10	10
SXT 25	>16	11-15.	<10	6	6	25	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
VA 30	>17	15 - 16	<14	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
AMP 10	>17	14-16	<13	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
ENR 5	>23	17 - 22	<16	19	6	17	21	7	6	6	17	6	6	6	30	6	6	6

Abr	S	I	R	E46	E47	E48	E49	E50	E51	E52	E53	E54	E55	E56	E57	E58	E59	E60	E61	E62	E63
Ab	S	I	R	CVSP83a	C36	CVSP84	CVSP85	CVSP89	CVSP93	CVSP94	CVSP98a	CVPP12a	CVSP100a	C2c	CVSP99	C20b	CVSP60b	C19b	C29b	C17b	C30b
AK30	>17	15-16	<14	19	17	19	17	17	18	19	18	20	18	15	23	19	20	19	22	20	17
CN10	>15	13-14	<12	16	16	10	16	17	6	15	15	6	8	6	21	9	18	19	19	19	19
TZP 110	>21	18-20	<17	24	22	22	24	23	23	22	22	24	21	23	29	21	24	30	29	30	25
ATM 30	>21	18-20	<17	18	13	13	13	13	10	14	13	13	14	11	18	14	24	18	22	17	6
AMC30	>18	14-17	<13	18	9	15	21	19	8	17	7	20	10	20	26	18	21	26	24	24	17
SAM 20	>15	12-14.	<11	18	11	10	14	14	11	12	11	14	9	14	17	14	15	21	22	19	14
MEM 10	>23	20-22	<19	29	25	29	26	26	28	29	26	27	26	28	33	27	32	33	32	30	33
IMP10	>23	20-22	<19	21	21	27	27	25	24	26	22	26	27	29	32	26	27	30	29	31	31
FEP30	>25	19 - 24	<18	20	25	19	18	14	20	17	12	17	15	13	21	19	19	21	22	18	22
CRO30	>23	20-22	<19	6	16	9	13	9	10	8	8	6	9	10	15	11	16	12	15	13	15
CAZ30	>21	18-20	<17	23	17	24	20	18	16	22	17	24	19	19	24	19	30	23	25	24	24
CAZ30	>21	18-20	<17	23	16	22	18	16	16	22	16	15	12	19	25	16	26	22	24	23	26
CTK 30	>26	23-25	<22	17	9	10	9	7	6	11	8	7	9	7	16	11	19	11	16	12	9
FOX30	>18	15-17	<14	10	24	22	23	21	9	22	8	24	23	20	27	24	28	25	28	28	27
CIP 5	>21	16-20	<15	14	20	6	20	6	12	13	12	12	16	6	13	20	26	32	28	23	6
NA 30	>19	14-18	<13	6	6	6	13	6	6	6	6	6	16	6	6	16	23	27	29	16	6
E 15	>23	14 - 22	<13	10	8	10	8	13	6	6	6	6	8	6	10	7	10	9	14	11	6
CT 10	>11		<10	11	10	11	10	11	12	11	11	11	10	12	12	12	12	12	12	12	9
SXT 25	>16	11-15.	<10	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	24	6	6	29	31	24	6
VA 30	>17	15 - 16	<14	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
AMP 10	>17	14-16	<13	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
ENR 5	>23	17 - 22	<16	8	18	6	18	6	6	8	7	8	17	6	8	20	23	32	28	21	6

Abr	S	I	R	E65	E66	E67	E68	E69	E70	E71	E72	E73	E74	E75	E76	E77	E78	E79
Ab	S	I	R	C37b	CVPP07c	C18b	C18a	CVSP73b	CVSP68b	CVSP57b	CVSP62b	C2b	CVSP45E2	CVSP45E3	C14b	CVSP48E2	CVSP47E2	CVSP17sb
AK30	>17	15-16	<14	20	17	14	15	17	17	18	19	16	17	20	19	21	21	20
CN10	>15	13-14	<12	17	6	16	15	16	15	16	17	6	15	18	18	18	18	18
TZP 110	>21	18-20	<17	25	25	19	21	26	24	23	25	23	25	28	13	7	26	22
ATM 30	>21	18-20	<17	21	12	17	14	11	8	21	14	11	14	22	15	16	14	22
AMC30	>18	14-17	<13	19	22	13	16	25	20	18	18	18	22	19	17	8	18	15
SAM 20	>15	12-14.	<11	13	15	11	13	20	16	13	16	11	16	19	14	6	15	12
MEM 10	>23	20-22	<19	28	28	27	27	26	28	27	28	30	28	30	28	30	31	31
IMP10	>23	20-22	<19	28	27	25	27	28	28	27	27	32	26	29	23	28	31	27
FEP30	>25	19 - 24	<18	26	16	18	20	15	18	16	19	11	20	17	13	18	15	16
CRO30	>23	20-22	<19	20	11	10	14	12	14	14	11	6	11	12	9	9	11	13
CAZ30	>21	18-20	<17	20	22	20	22	20	12	25	23	16	26	27	19	23	17	24
CAZ30	>21	18-20	<17	19	20	22	21	19	13	25	24	18	22	27	15	23	15	25
CTK 30	>26	23-25	<22	18	9	11	10	9	10	16	12	6	11	14	11	14	11	17
FOX30	>18	15-17	<14	10	21	22	21	22	20	24	24	21	21	25	26	25	21	24
CIP 5	>21	16-20	<15	12	7	6	6	6	21	11	27	6	23	15	12	13	12	22
NA 30	>19	14-18	<13	6	6	6	6	6	17	6	22	6	6	18	6	6	6	18
E 15	>23	14 - 22	<13	11	11	6	6	10	11	12	8	6	9	12	9	6	9	6
CT 10	>11		<10	11	11	11	11	11	11	11	11	12	11	12	12	11	12	11
SXT 25	>16	11-15.	<10	22	6	6	6	6	6	6	20	6	6	6	6	6	6	6
VA 30	>17	15 - 16	<14	6	6	6	6	6	6	6	7	6	6	6	6	6	6	6
AMP 10	>17	14-16	<13	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
ENR 5	>23	17 - 22	<16	9	6	6	6	6	21	7	27	6	21	24	7	8	7	18

**Amikacina (AK30), Gentamicina (CN10), Piperacilina / Tazobactam (TZP110) AmpC, Aztreonam (ATM30), Cefepime (CEP30) BLEE, Ceftazidina (CAZ30) AmpC/BLEE, Cefoxitin (FOX30), Ac. Nalidíxico (NA30), Colistina (CT10), Vancomicina (VA30), Enrofloxacina (ENR5), Imipenem (IMP10) AmpC, Ceftriaxona (CRO30) BLEE, Cefotaxima (CTK30), Ciprofloxacina (CIP5), Eritromicina(E15), Sulfametoxazol / Trimetropin (SXT25), Ampicilina (AMP30).**