

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA



**DETERMINACIÓN DE ANTIBIORRESISTENCIA DE CEPAS DE
Escherichia coli AISLADAS EN CARNE DE POLLO EN LA CIUDAD DE
AMBATO, PROVINCIA DE TUNGURAHUA**

DOCUMENTO FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN COMO
REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MÉDICO VETERINARIO

AUTOR: KATERIN ANAHÍ CASTRO VELASCO

TUTORA: Dra. SANDRA CRUZ, PhD.

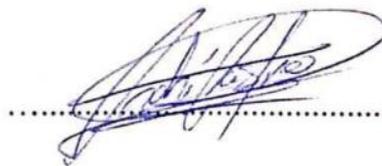
CEVALLOS - ECUADOR

2023

Cevallos, 28 de Julio del 2023

AUTORÍA DEL TRABAJO DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, KATERÍN ANAHÍ CASTRO VELASCO, portador de la cédula de identidad número: 1753764875, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de Investigación titulado: DETERMINACIÓN DE ANTIBIORRESISTENCIA DE CEPAS DE *Escherichia coli* AISLADAS EN CARNE DE POLLO EN LA CIUDAD DE AMBATO, PROVINCIA DE TUNGURAHUA es original, auténtico y personal. En la virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indica las fuentes de información consultadas.



Katerín Anahí Castro Velasco

C.I. 1753764875

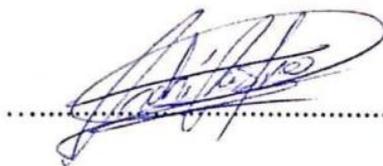
AUTOR

DERECHOS DEL AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado DETERMINACIÓN DE ANTIBIORRESISTENCIA DE CEPAS DE *Escherichia coli* AISLADAS EN CARNE DE POLLO EN LA CIUDAD DE AMBATO, PROVINCIA DE TUNGURAHUA, como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Médico Veterinario, 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 suponga 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 de parte de él.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Katerín Anahí Castro Velasco', written over a horizontal dotted line.

Katerín Anahí Castro Velasco

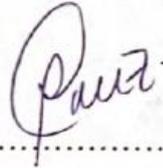
C.I. 1753764875

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

DETERMINACIÓN DE ANTIBIORRESISTENCIA DE CEPAS DE *Escherichia coli*
AISLADAS EN CARNE DE POLLO EN LA CIUDAD DE AMBATO, PROVINCIA
DE TUNGURAHUA

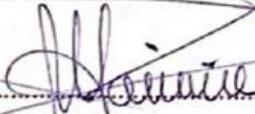
REVISADO POR:



.....
Dra. Sandra Cruz PhD.

TUTORA

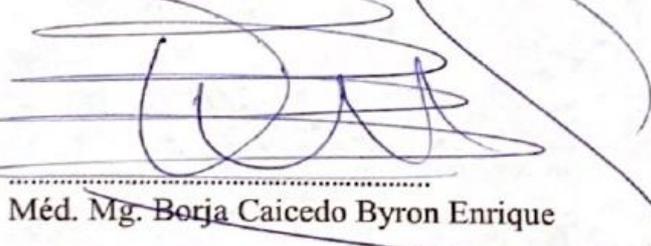
FECHA



.....
Ing. Patricio Núñez, PhD.

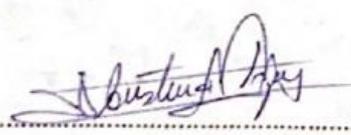
PRESIDENTE DE TRIBUNAL

31/08/2023


.....
Méd. Mg. Borja Caicedo Byron Enrique

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIONES

31/08/2023


.....
BQF. Mg. López Villacís Isabel Cristina

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIONES

31/08/2023

DEDICATORIA

A mis padres por siempre apoyarme, por ser mi fortaleza y debilidad. Por estar conmigo en cada momento y hacerme sentir valiente.

A Balto y Alaska, por ser mi lugar seguro, por ser mis compañeros y darme su amor puro e incondicional.

AGRADECIMIENTOS

*A mis padres por siempre luchar por mí y apoyarme en cada decisión de mi vida.
Gracias por todo su esfuerzo, paciencia y amor.*

*A la Dra. Sandra Cruz, mi tutora de tesis, por guiarme e instruirme con paciencia en
cada paso para el desarrollo del presente proyecto de investigación.*

Gracias por todos los conocimientos que me ha regalado.

A todos mis docentes de la carrera, por siempre enseñarme con firmeza y disciplina.

*Gracias por inculcarme el amor a la Medicina Veterinaria y formar parte de mi
formación académica.*

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN..... | 1 |
| ABSTRACT..... | 2 |
| CAPITULO I..... | 3 |
| MARCO TEÓRICO..... | 3 |
| 1.1.ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS..... | 4 |
| 1.2. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES..... | 10 |
| 1.2.1.Resistencia a Antibióticos..... | 10 |
| 1.2.2.Métodos para determinación de Antibiorresistencia..... | 11 |
| 1.2.3.Características de <i>Escherichia coli</i> | 12 |
| 1.2.4. Clasificación taxonómica de <i>E.coli</i> | 12 |
| 1.2.5. Características colonias de <i>E.coli</i> | 13 |
| 1.2.6. Modo de transmisión..... | 13 |
| 1.2.7. Mecanismo de resistencia de <i>Escherichia coli</i> | 14 |
| 1.2.7.1 Hidrólisis enzimática..... | 14 |
| 1.2.7.2 Mutación enzimática de antibióticos | 14 |
| 1.2.7.3 Modificaciones en el sitio blanco..... | 15 |
| 1.3. OBJETIVOS | 16 |
| 1.3.1. Objetivo general..... | 16 |
| 1.3.2. Objetivos específicos..... | 16 |
| 1.4HIPÓTESIS | 16 |
| CAPÍTULO II..... | 17 |
| METODOLOGÍA | 17 |
| 2.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO..... | 17 |
| 2.2. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR..... | 17 |
| 2.3. EQUIPOS Y MATERIALES | 18 |
| 2.4. FACTORES DE ESTUDIO..... | 19 |

| | |
|--|----|
| 2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 20 |
| 2.5.1. Tamaño de la muestra..... | 20 |
| 2.5.2. Diseño experimental..... | 20 |
| 2.6. METODOLOGÍA..... | 21 |
| 2.6.1. Fase 1. Refrescamiento de cepas de <i>Escherichia coli</i> en TS... | 21 |
| 2.6.1.1. Preparación de Agar Trypticasa de Soya (TM MEDIA)..... | 21 |
| 2.6.1.2. Siembra de cepas de <i>Escherichia coli</i> | 22 |
| 2.6.2. Siembra de colonias en caldo Cerebro-Corazón (TM MEDIA)..... | 22 |
| 2.6.2.1. Preparación de Caldo Cerebro Corazón (TM Media)..... | 22 |
| 2.6.2.2 Siembra de colonias de <i>E.coli</i> en caldo Cerebro-Corazón | 23 |
| 2.6.3. Siembra de <i>E.coli</i> en Müller Hinton para antibiorresistencia..... | 24 |
| 2.6.3.1. Preparación de Agar Müller Hinton (TM MEDIA) | 24 |
| 2.6.3.2.Siembra de <i>E.coli</i> en Agar Müller Hinton..... | 25 |
| 2.6.3.3. Colocación de discos de antibióticos..... | 25 |
| 2.6.4. Lectura de resultados..... | 25 |
| 2.6.5. Fase 2. Determinar CMI de cepas Sensibles (S) a los antibióticos..... | 26 |
| 2.6.5.1. Refrescar y sembrar las cepas de <i>E.coli</i> en TS..... | 26 |
| 2.6.5.2.Siembra de colonias en LB..... | 27 |
| 2.6.5.2.1. Preparación de Luria Bertani..... | 27 |
| 2.6.5.2.2. Siembra de colonias en LB..... | 27 |
| 2.6.5.3. Preparación de diluciones de antibióticos en diferentes concentraciones | 28 |
| 2.6.5.4. Lectura de Resultados | 31 |
| 2.6.5.5. Determinación de concentraciones definitivas..... | 31 |
| 2.7. VARIABLES RESPUESTA..... | 32 |

| | |
|---|-----------|
| 2.7.1. Cualitativas..... | 32 |
| 2.7.2. Cuantitativas..... | 33 |
| 2.8. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN..... | 33 |
| CAPÍTULO III..... | 34 |
| ANÁLISIS Y DISCUSIONES DE RESULTADOS..... | 34 |
| 3.1. PRUEBA DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS (ANTIBIORRESISTENCIA) | 34 |
| 3.2. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) | 43 |
| 3.2.1. CMI de Amikacina (AK) | 45 |
| 3.2.2. CMI de Gentamicina (CN) | 46 |
| 3.2.3 CMI de Ciprofloxacina (CIP) | 50 |
| 3.2.4 CMI de Ceftriaxona (CRO) | 53 |
| 3.2.5 CMI de Amoxicilina + ácido clavulánico..... | 54 |
| 3.3. MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTENCIA DE <i>Escherichia coli</i> a AK, CIP, CN, CRO, AMC..... | 58 |
| 3.3.1. Mecanismo de resistencia de <i>E.coli</i> a Betalactámicos..... | 60 |
| 3.3.2. Mecanismo de resistencia de <i>E.coli</i> a Aminoglucósidos..... | 61 |
| 3.3.3. Mecanismo de resistencia de <i>E.coli</i> a Fluoroquinolonas..... | 63 |
| 3.4. VERIFICACIÓN DE HIPÓTESIS..... | 63 |
| CAPÍTULO IV..... | 66 |
| CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 66 |
| 4.1. CONCLUSIONES..... | 66 |
| 4.2. RECOMENDACIONES..... | 67 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 68 |
| ANEXOS..... | 74 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| TABLA 1. TAXONOMÍA DE <i>Escherichia coli</i> | 12 |
| TABLA 2. CARACTERÍSTICAS DEL CANTÓN CEVALLOS..... | 17 |
| TABLA 3. EQUIPOS Y MATERIALES..... | 18 |
| TABLA 4. DISCOS DE ANTIBIÓTICOS..... | 19 |
| TABLA 5. HALOS DE ANTIBIÓTICOS (mm)..... | 26 |
| TABLA 6. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)..... | 28 |
| TABLA 7. BATERIA DE CONCENTRACIONES DE PRUEBA PARA CMI..... | 29 |
| TABLA 8. CONCENTRACIONES DE PRUEBA EN μL | 30 |
| TABLA 9. BATERIAS DE DILUCIONES PARA CMI..... | 32 |
| TABLA 10. SENSIBILIDAD <i>in vitro</i> de cepas de <i>Escherichia coli</i> AISLADAS EN CARNE DE POLLO FRENTE A CINCO ANTIBIOTICOS (AK,CIP,CN,CRO,AMC)..... | 36 |
| TABLA 11. EFECTIVIDAD DE 5 ANTIBIÓTICOS (AK,CIP,CN,CRO,AMC) MEDIANTE ENSAYO DE SENSIBILIDAD <i>in vitro</i> DE CEPAS DE <i>Escherichia coli</i> AISLADAS EN CARNE DE POLLO..... | 40 |
| TABLA 12. RESULTADOS F1 (ANTIBIORRESISTENCIA) CEPA 56 Y 02P2R1D2E3..... | 59 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1.MORFOLOGÍA DE <i>Escherichia coli</i> | 12 |
| FIGURA 2.PORCENTAJE DE RESISTENCIA DE <i>E.coli</i> | 35 |
| FIGURA 3. PORCENTAJE DE ANTIBIORRESISTENCIA INTERMEDIA DE AISLADOS DE <i>E.coli</i> | 36 |
| FIGURA 4. MEDIA DE CEPAS DE <i>E.coli</i> MÁS SENSIBLES Y RESISTENTES A LOS 5 ANTIBIÓTICOS..... | 38 |
| FIGURA 5. PORCENTAJE Y NÚMERO DE CEPAS SENSIBLES A CN, AK, CIP..... | 41 |
| FIGURA 6. PORCENTAJE Y NÚMERO DE CEPAS SENSIBLES A LOS 5 ANTIBIÓTICOS..... | 44 |
| FIGURA 7. CURVA DE INHIBICIÓN DE PRUEBA PARA AK..... | 45 |
| FIGURA 8. CURVA DE INHIBICIÓN MÁS Y MENOS SENSIBLES A AK..... | 46 |
| FIGURA 9. CURVA DE INHIBICIÓN DE PRUEBA PARA CN..... | 47 |
| FIGURA 10. CURVA DE INHIBICIÓN MÁS Y MENOS SENSIBLE PARA CN..... | 48 |
| FIGURA 11. CURVA DE INHIBICIÓN DE PRUEBA PARA CIP..... | 50 |
| FIGURA 12. CURVA DE INHIBICIÓN MÁS Y MENOS SENSIBLE PARA CIP.. | 51 |
| FIGURA 13. CURVA DE INHIBICIÓN PARA CRO..... | 53 |
| FIGURA 14. CURVA DE INHIBICIÓN MÁS Y MENOS SENSIBLE PARA CRO..... | 54 |
| FIGURA 15. CURVA DE INHIBICIÓN DE PRUEBA PARA AMC..... | 55 |
| FIGURA 16. CURVA DE INHIBICIÓN MÁS Y MENOS SENSIBLE PARA AMC..... | 56 |
| FIGURA 17. MECANISMO DE RESISTENCIA BACTERIANA..... | 58 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| ANEXO 1. TABULACIÓN RESULTADOS FASE 1 (ANTIBIORRESISTENCIA) | 74 |
| ANEXO 2. CÁLCULO ESTADÍSTICO, TABLA DE EXCEL FASE 1 (ANTIBIORRESISTENCIA)..... | 74 |
| ANEXO 3. FOTOGRAFÍAS DE ACTIVIDADES REALIZADAS DURANTE LA INVESTIGACIÓN..... | 75 |
| ANEXO 4. TABULACIÓN DE RESULTADOS FASE 2 (CMI)..... | 77 |
| ANEXO 5. DETERMINACIÓN CEPAS MÁS Y MENOS SENSIBLES A LOS ANTIBIÓTICOS (CN)..... | 77 |
| ANEXO 6. FOTOGRAFÍAS DE ACTIVIDADES REALIZADAS DURANTE LA INVESTIGACIÓN (FASE 2)..... | 78 |

RESUMEN

Escherichia coli presenta mecanismos de resistencia hacia los antibióticos significativamente altos y bastante desarrollados, representando un problema a nivel mundial para la salud pública, una de sus vías de transmisión es en alimentos de origen animal, destacando que la diseminación se facilita por la escasa higiene y control sanitario en los lugares de faenamiento. El objetivo de la presente investigación fue determinar la antibiorresistencia de cepas de *Escherichia coli* aisladas en carne de pollo en la ciudad de Ambato, Provincia de Tungurahua. Se trabajó con un total de 31 cepas de *E.coli* sometidas a dos fases de investigación, la primera para establecer la Resistencia, Intermedia o Sensibilidad de las cepas al grupo de antibióticos: Amikacina, Gentamicina, Amoxicilina+ ácido clavulánico, Ceftriaxona, Ciprofloxacina a través del método fenotípico Kirby Bauer (Disco-placa), los resultados fueron sometidos a prueba de Kruskal Wallis complementada con la prueba U de Mann Whitney, obteniendo una Resistencia CIP: 45% , CRO:25,8%, AMC: 9,8% , CN y AK: 0%, siguiendo puntos de corte de CLSI 2023. En la segunda fase se determinó la CMI (Concentración mínima inhibitoria) de las cepas resultantes sensibles en la fase 1 al grupo de antibióticos, los resultados se analizaron descriptivamente a través de curvas estableciendo la CMI de AK: 18-20 µg/ml CN: 18-22 µg/ml CIP: 19-21 µg/ml CRO:18-22 µg/ml AMC: 28-33 µg/ml, siguiendo puntos de corte de CLSI 2023. Los principales mecanismos de resistencia de *Escherichia coli* a betalactámicos son las betalactamasas, a los aminoglucósidos las mutaciones en grupos aminos e hidroxilos y alteración de sitios diana y en las fluoroquinolonas se producen mutaciones cromosómicas en ADN girasa y Topoisomerasa, todos estos métodos desarrollados por *E.coli* bloquean la acción de los fármacos. En conclusión, se determinó que *E. coli* muestra una marcada resistencia a los antibióticos gracias a métodos de resistencia que presenta la bacteria a través de enzimas y mutaciones.

Palabras Clave: *Escherichia coli*, antibiorresistencia, CMI, Betalactámicos, Aminoglucósidos y Fluoroquinolonas.

ABSTRACT

Escherichia coli presents significantly high and well-developed resistance mechanisms towards antibiotics, representing a worldwide problem for public health, one of its transmission routes is in food of animal origin, noting that the dissemination is facilitated by poor hygiene and Sanitary control in slaughterhouses. The objective of the present investigation was to determine the antibioresistance of *Escherichia coli* strains isolated in chicken meat in the city of Ambato, Tungurahua Province. We worked with a total of 31 *E.coli* strains subjected to two research phases, the first to establish the Resistance, Intermediate or Sensitivity of the strains to the group of antibiotics: Amikacin, Gentamicin, Amoxicillin + clavulanic acid, Ceftriaxone, Ciprofloxacin through of the Kirby Bauer phenotypic method (Disc-plaque), the results were subjected to the Kruskal Wallis test complemented with the Mann Whitney U test, obtaining a CIP Resistance: 45%, CRO: 25.8%, AMC: 9.8% , CN and AK: 0%, following CLSI 2023 cut-off points. In the second phase, the MIC (Minimum Inhibitory Concentration) of the resulting strains sensitive to the group of antibiotics in phase 1 was determined, the results were analyzed descriptively through of curves establishing the MIC of AK: 18-20 µg/ml CN: 18-22 µg/ml CIP: 19-21 µg/ml CRO:18-22 µg/ml AMC: 28-33 µg/ml, following points of CLSI 2023 cutoff. The main resistance mechanisms of *Escherichia coli* to beta-lactams are beta-lactamases, to aminoglycosides mutations in amino and hydroxyl groups and alteration of target sites and in fluoroquinolones chromosomal mutations in DNA gyrase and topoisomerase occur, all of these methods developed by *E.coli* block the action of drugs. In conclusion, it was determined that *E. coli* shows a marked resistance to antibiotics thanks to resistance methods that the bacteria presents through enzymes and mutations.

Keywords: *Escherichia coli*, antibioresistance, CMI, beta-lactams, aminoglycosides and fluoroquinolones.

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

La resistencia a antibióticos representa un problema para la salud pública que ha incrementado exponencialmente en los últimos años, entre las bacterias con mayor capacidad para mutar o crear mecanismos de antibiorresistencia se destaca *Escherichia coli*, una gram negativa de amplia y fácil distribución, que se encuentra como principal contaminante en productos de consumo humano sobre todo carne de pollo, desencadenado por la escasa higiene y medidas sanitarias de control. *E.coli* ha mostrado un perfil de resistencia marcada a los antibióticos más empleados en la terapéutica de infecciones provocadas por esta e inclusive en fármacos relativamente poco empleados.

El presente estudio busca establecer la resistencia a antibióticos que presenta diferentes cepas de *Escherichia coli* aisladas en carne de pollo expandidas en la ciudad de Ambato, provincia de Tungurahua, con la finalidad de aportar información importante acerca de la capacidad de *E.coli* para inhibir los mecanismos de acción de los fármacos, además, de determinar las dosis efectivas (CMI) para bloquear el crecimiento del microorganismo. El trabajo investigativo representa un gran impacto y relevancia para la salud pública al tener como unidad de análisis la carne de pollo, producto de consumo humano. Evidenciando así la necesidad de la investigación al hacer un enfoque en *E.coli* una las principales bacterias causantes de infecciones.

El trabajo investigativo se realiza en dos fases, primero a través del método fenotípico Kirby Bauer que determinará las cepas Resistentes (R), Intermedias (I), Sensibles (S) por medición de halos siguiendo los puntos de corte descritos por CLSI, 2023 (The Clinical & Laboratory Standards Institute). En la segunda fase en las cepas Sensibles (S) se establecerá la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) a través de densidad

óptica por interpretación de curva de crecimiento en un espectrofotómetro. Además, se describirá los mecanismos moleculares de resistencia de *Escherichia coli* por análisis literario.

1.1. Antecedentes investigativos

Según López-Velandia (2021), en su estudio “Genes de resistencia a aislados de *Escherichia coli* en pollos de engorda” se obtuvieron muestras a través de hisopado de distintos órganos de 200 pollos, obteniendo 35 cepas de *E.coli* las cuales fueron sometidas a método de Kirby Bauer empleando los discos: ceftriaxona (CRO 30 µg) cefotaxima (CTX 30 µg), Cefepima (FEP 30 µg), ácido nalidíxico (FEP 30 µg) ciprofloxacina (CIP 1 µg), Norfloxacina (NOR 2 µg), piperacilina (PRL 30 µg), aztreonam (ATM 30 µg) y amoxicilina/ácido clavulánico (AMC 30 µg).

Los antibióticos más sensibles dentro de la investigación fue el ácido nalidíxico con 97% de eficacia, seguido de amoxicilina/ácido clavulánico 97%, piperacilina y aztreonam 91% y los antimicrobianos con menor eficacia fueron Ceftriaxona con 63% y Cefotaxima 69%. Además, dentro del trabajo investigativo se determinó los genes de resistencia que presentaron los aislados de *E.coli* como mecanismo de resistencia a los betalactámicos: Gen blaCTXM fue de mayor impacto presente en un 86% de cepas, gen AmpC 83%, Gen blaTEM 57% y Gen blaSHV 54% (López-Velandia, 2021).

En la investigación realizada por Carvajal et al. (2019) con el objetivo de determinar la sensibilidad de cepas de *E.coli* en aislados de pollo a 18 fármacos frecuentemente empleados en avicultura. Se obtuvieron 46 cepas de *E.coli* procedentes de bolsa de Fabricio las cuales fueron sometidas al método de Kirby Bauer para determinar resistencia o sensibilidad. Los antibióticos empleados en la investigación fueron: AMP30, FFC30, K30, SAM20, GM10, NOR10, C30, CIP5, AMC20/10, AML10, STX25, CF30, CL30, CM30, FOX30, CTX30, CAZ30, CEP30.

Los perfiles de resistencia fueron descritos por familias farmacológicas de forma que los aislados de *E.coli* mostraron una resistencia a betalactámico de 91%, específicamente en las cefalosporinas se estableció que en las Cefalosporinas de 1era generación 100%, 2da generación 96%, 3era generación 82%, 4ta generación 84%. Para los aminoglucósidos se determinó un 43%, quinolonas 54% y para las sulfonamidas 70% (Carvajal et al., 2019).

Según Castro & Schettini (2020) en su investigación sobre la resistencia de *Escherichia coli* aisladas en heces de avicultores que presentan una gran exposición a la bacteria, generalmente por la escasa higiene que suele tenerse en los galpones. Para la identificación de *E.coli* se empleó las técnicas de coprocultivo en Agar MacConkey y para determinar la susceptibilidad bacteriana se empleó la técnica de Kirby Bauer con los antibióticos: Tetraciclina, Fosfomicina, Imipenem, Meropenem, Amikacina, Gentamicina, Nitrofurantoína, Amoxicilina+ ácido clavulánico, ciprofloxacina y Ampicilina.

Los resultados descritos en cuanto a perfiles de resistencia fueron (Castro & Schettini, 2020):

Resistentes

- Gentamicina y meropenem (100%)
- Ampicilina (57,1%)
- Amoxicilina + ácido clavulánico, ciprofloxacina y cefalexina (50%)
- Amikacina (33,3%)

Sensibles

- Fosfomicina (66,7%)
- Ceftriaxona (41,6%)
- Imipenem (100%)
- Trimetropin + sulfametoxazol (45,5%)
- Cefuroxima 41,6%

Según Villacis-Jara, Granda y Irazabal (2019) en su estudio se trabajó con 148 cepas de *E.coli* las cuales fueron sometidas a método Kirby Bauer para determinar sensibilidad, donde se empleó: gentamicina (GN -10µg), cloranfenicol (CL - 30µg), ceftriaxona (CRO - 30µg), eritromicina (E - 15µg) ampicilina (AM - 10µg), amoxicilina (AM - 30µg), ampicilina – sulbactam (SAM - 30µg), amoxicilina – ácido clavulánico (Aµg - 30µg), ciprofloxacina (CIP - 5µg), trimetoprim – sulfametoxazol (STX - 25µg), meropenem (MEM - 10µg) y tetraciclina (TE - 30µg).

La interpretación de la resistencia presente ante los antibióticos por parte de *E.coli* se basó en las tablas de CLSI, de forma que se obtuvo GN 17,6%, CRO 27,7%, AM 54,4%, AMC 7,4%, CIP 52%, MEM 0%, E100%,AX 48,6%,SXT 56,8% Y T 74,3% (Villacis-Jara, Granda & Irazabal, 2019).

En el estudio realizado por Vinueza-Burgos et al. (2019) para determinar la resistencia de *Escherichia coli* a cefotaxima, se analizaron 176 aislamientos provenientes ciegos de pollos de engorde en Ecuador. El método empleado fue disco-placa (Kirby Bauer) en agar TBX suplementado con 3mg/L de Cefotaxima. El análisis de la lectura se determinó siguiendo las tablas de la CLSI donde se especifica el tamaño de los halos.

Los resultados del estudio determinaron: 98,3% de los aislados de *E.coli* mostraron multiresistencia a varios fármacos de uso común, específicamente Trimetropim-sulfametoxazol 69.1%, Ciprofloxacina 72.2%, Gentamicina 47.3%, Kanamicina 40%, Estreptomina 82,7%, Tetraciclina 86,4%, Ceftadizina 29.1% (Vinueza-Burgos et al., 2019).

Se analizó también la Concentración Mínima Inhibitoria de algunos fármacos, considerados como primera línea ante infecciones causadas por *E.coli*, siguiendo los puntos de corte de la CLSI se determinó la CMI: TPZ \geq 128 µg/ml, CIP \geq 4 µg/ml, AK \geq 2 µg/ml, AMP \geq 32 µg/ml, CRO \geq 16 µg/ml, GEN \geq 16 µg/ml, ERT \geq 0,5 µg/ml, COL \geq 16 µg/ml (Vinueza-Burgos et al.2019).

Los resultados arrojados de la investigación realizada por Carvajal et al. (2021) en un total de 176 cepas de *Escherichia coli* aisladas a partir de diferentes órganos en pollos broiler, las cuales fueron sometidas a método de Kirby Bauer con la finalidad de poner a prueba la efectividad de los siguientes antibióticos: Ampicilina 10 µm, amoxicilina/ácido clavulánico 20/10 µm, piperacilina 100 µm, piperacilina/tazobactam 100/10 µm, cefalotina 30 µm, cefuroxima 30 µm, Cefoxitin 30 µm, cefotaxima 30 µm, ceftazidima 30 µm, ceftriaxona 30 µm, Cefepime 30 µm, ácido nalidíxico 30 µm, Norfloxacin 10 µm y ciprofloxacino 5 µm.

Los resultados obtenidos se evaluaron según los parámetros recomendados por CLSI, determinando una resistencia de Ampicilina 100%, Cefuroxima 98.8%, Amoxicilina + ácido clavulánico 98.9%, Cefalotina 97.7%, Piperacilina+ tazobactam 97%, Cefoxitina 96.6%, Cefotaxima 96,6%, Piperacilina 95,5%, Ceftazidima 93.2%, Ceftriaxona 92%, Cefepime 83% (Carvajal et al., 2021).

Según Amancha et al. (2023) los resultados obtenidos en su investigación donde se recolectaron 383 muestras de carne de pollo procedentes de mataderos de todo el Ecuador, aislándose un total de 148 cepas de *Escherichia coli* las cuales fueron sometidas a método de Kirby Bauer para determinar antibiorresistencia ante 10 antimicrobianos de importancia crítica y 3 antibióticos fundamentales en terapéuticas por *E.coli*.

Siguiendo las recomendaciones de CLSI se determinaron los siguientes porcentajes de resistencia: Eritromicina 73%, Tetraciclina 71%, Trimetropin + sulfametoxazol 57%, Ampicilina 50%, Ciprofloxacina 39%, Amoxicilina 47%, Gentamicina 12%, Amoxicilina+ ácido clavulánico 5%, Ampicilina+Sulbactam 3%, Meropenem 0%, (Amancha et al., 2023).

Brito (2019) en su investigación con la finalidad de determinar la resistencia microbiana de *Escherichia coli*, trabajo con 6 cepas de *E.coli* certificadas, las cuales fueron aisladas a partir de muestras cárnicas. El método empleado fue Kirby Bauer

donde empleo los antibióticos: Cloranfenicol, Tetraciclina, Gentamicina, Ampicilina y Trimetropim/Sulfametoxazol para cada antibiótico se realizaron 3 réplicas para mayor confiabilidad de resultados.

Una vez medido los halos de inhibición se tomó como referencia los puntos de corte determinados por la CLSI para concluir como resistente (R), intermedio (I) o sensible (S) la reacción de la bacteria al antibiótico. Concluyendo que para cloranfenicol todas las cepas fueron sensibles, para Tetraciclina dos cepas sensibles, una intermedia y una resistente, Gentamicina y Trimetropin/Sulfametoxazol todas las cepas sensibles, Ampicilina tres cepas sensibles y una intermedia (Brito, 2019).

Velásquez (2023) con la finalidad de determinar la antibiorresistencia de *Escherichia coli* en muestras aisladas de carne de pollos de engorde, trabajo con informes técnicos presentados por Labvetsur S.A desde enero 2010 - diciembre 2019, donde se realizaron cultivos y antibiogramas positivos para *E.coli* siendo un total de 4452.

Para la realización de los antibiogramas se empleó el método Kirby Bauer donde se probaron distintos antibióticos pertenecientes a las familias: Aminoglucósidos, Aminopenicilinas, Fluoroquinolonas, Betalactámicos, Cefalosporinas, Macrólidos, tetraciclinas, lincosamidas y algunas combinaciones entre familias como: Macrólidos +Fluoroquinolonas, lincosamidas + aminoglucósidos (Velásquez, 2023).

Los resultados obtenidos se tabularon según los criterios de corte de la CLSI. (Velásquez, 2023), decidió reportarlos en familias de antibióticos dado el tamaño de las muestras, entre sus resultados más significativos se describe:

- Aminoglucósidos S= 4,85%, I=1,3%, R=5,23%
- Betalactámicos S=0%, I=0,02%, R=0,45%
- Cefalosporinas S=0,62%, I= 0,36%, R=1,5%
- Fluoroquinolonas S=4,22%, I=3,28%, R=14,78%
- Polimixinas + Sulfonamidas S= 3,35%, I=0,20%, R=0,83%
- Tetraciclinas+ Macrólidos S=1,42%, I=0,18%, R=1,19%

- Betalactámicos+ Aminoglucósidos S=0,02%, I=0%, R=0,25%

Según Reyes-Baque et al. (2021) el objetivo de su investigación fue determinar la resistencia de *Escherichia coli* ante los antimicrobianos usados de forma habitual en la avicultura. Se trabajó con un total de 83 muestras las cuales fueron confirmadas como *E.coli*.

Para la realización del antibiograma se empleó el método de Kirby Bauer y para la interpretación de resultados se siguió la tabla descrita por la CLSI para determinar cómo Resistente, Intermedia o Sensible, según el crecimiento de los halos, sin embargo, no se consideró como importante la descripción de las cepas intermedias (Reyes-Baque et al., 2021).

Resistentes

- Cefalexina 50%, Gentamicina 100%, Ampicilina 57,1%, Amikacina 33%, Amoxicilina+ ácido clavulánico 50%, Ciprofloxacina 50%

Sensibles

- Fosfomicina 66,7%, Ceftriaxona 41,6%, Nitrofurantoina 83,3%, Cefotaxima 100%, Trimetropim + Sulfametoxazol 45,5%

1.2. Categorías fundamentales

1.2.1. Resistencia a Antibióticos

La antibiorresistencia es un problema creciente para la salud pública a nivel mundial desencadenada principalmente por el uso inadecuado de los antibióticos (Giono-

Cerezo et al., 2020). La resistencia a antibióticos es la capacidad de una bacteria para desarrollar mecanismos de evasión o resistencia ante la acción de un fármaco (Brito, 2019). Esto se produce por la aptitud del microorganismo para mutar a nivel cromosómico, además, se destaca la capacidad de transferir el material genético alterado a otras bacterias ya sea de forma vertical (generación en generación) u horizontal a través de plásmidos o integrones (Egas, 2018).

Una de las bacterias que ha presentado una antibiorresistencia creciente en los últimos años es *Escherichia coli*, representando un problema para la salud pública a nivel mundial, los principales mecanismos de resistencia de *E.coli* y otras bacterias son (Mosquito et al., 2020):

- **Expulsión del antibiótico:** El microorganismo presenta la capacidad de expulsar al antibiótico desde el interior celular, gracias a la formación de una bomba de flujo que arroja el antimicrobiano sin causar daños a la célula bacteriana (Mosquito et al., 2020).
- **Enzimas hidrolíticas:** Se trata de la capacidad de las bacterias para producir una gran cantidad de enzimas que modifican o inhiben la acción antibiótica, por ejemplo, *Escherichia coli*, es una productora de penicilinas que inhibe la actividad de la penicilina y otros betalactámicos (Mosquito et al., 2020).
- **Alteración de los receptores:** Se trata de una mutación en la que se modifican los receptores del microorganismo, inhibiendo la unión receptor-antibiótico de forma que se bloquea la acción del fármaco (Mosquito et al., 2020).

Escherichia coli ha aumentado su resistencia a los antibióticos, debido al uso de fármacos en animales de producción con fines profilácticos o como promotores del crecimiento, donde generalmente se emplean dosis más bajas de las recomendadas por periodos prolongados, provocando que la bacteria tenga la facilidad de producir mutaciones o nuevos genes para evadir o inhibir la acción de los fármacos (Castro & Schettini, 2020).

1.2.2. Métodos para determinación de Antibiorresistencia

El método de Kirby Bauer (disco-placa) se trata de un análisis fenotípico donde a través del crecimiento de halos bacterianos se determinará la resistencia o sensibilidad de un antibiótico ante determinada bacteria (March-Rosselló, 2019).

El fundamento de este método se basa en la colocación del disco con concentración de antibiótico en una placa Müller Hilton inoculada con la bacteria que al hacer contacto con la superficie se difunde en el agar y posterior 18-24 h se establecen halos de inhibición alrededor del disco que según el tamaño de estos se interpretara como sensible(S), intermedio (I), resistente (R) (Yang et al., 2019).

El método de dilución ya sea por micro o macro dilución tiene el objetivo de determinar la concentración mínima inhibitoria de un fármaco, es decir, la concentración más baja expresa en $\mu\text{g/ml}$ de un antibiótico para bloquear el crecimiento bacteriano (March-Rosselló, 2019).

Se fundamenta en una batería de diferentes concentraciones de un fármaco diluido en caldo cerebro corazón para posteriormente colocar la bacteria diluida en relación 1:1 en cada tubo con antibiótico y se procede a esperar de 18-24h donde se podrá evidenciar el crecimiento bacteriano hasta cierto punto donde este se inhibirá y por ende se determina que el fármaco bloqueo el crecimiento de forma que esta es la CMI (March-Rosselló, 2019).

1.2.3. Características generales de *Escherichia coli*

Figura 1. Morfología de *Escherichia coli*



Fuente: (Bello,2023)

E.coli es una enterobacteria gram negativa, anaerobia facultativa y con morfología de “bastón” de 0.5 micras de ancho por 1.0 - 3.0 micras de largo. Se mantiene estable en temperaturas entre 35-43°C y su crecimiento se limita a 7°C (Jang et al., 2019). Es un bacilo poco exigente en cuanto a nutrición, presenta flagelos peritricos que le permiten movilizarse. Bioquímicamente es oxidasa negativo y catalasa positivo (Brito, 2019).

Sobrevive en pH bajos, aptitud que se relaciona con la capacidad de *E.coli* para atravesar la barrera ácida del estómago y establecerse en el tracto gastrointestinal de animales de sangre caliente. En individuos sanos *E.coli* forma parte de la microbiota intestinal participando en la absorción de nutrientes, sin embargo, algunas cepas son patógenas al adquirir factores de virulencia afectando tanto animales como al ser humano (Brito, 2019).

1.2.4. Clasificación taxonómica de *E.coli*

Tabla 1. Taxonomía de *Escherichia coli*

| | |
|---------|----------------------------|
| Dominio | <i>Bacteria</i> |
| Filo | <i>Proteobacteria</i> |
| Clase | <i>Gammaproteobacteria</i> |
| Orden | <i>Enterobacterales</i> |
| Familia | <i>Enterobacteriaceae</i> |
| Género | <i>Escherichia</i> |
| Especie | <i>E.coli</i> |

Fuente: (Velasquez, 2023)

1.2.5. Características coloniales de *E.coli*

Las colonias de *Escherichia coli* se aíslan en medios de cultivos selectivos como Agar MacConkey donde *E.coli* se presenta con colonias de color rosado oscuro, con morfología circular de entre 2-4 mm de diámetro. En el Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) las colonias son de color negro, opacas y brillantes (Jang et al., 2019).

1.2.6. Modo de transmisión

Escherichia coli puede encontrarse en las avícolas por un deficiente control sanitario de la granja, se puede diseminar con facilidad en el agua de bebida, por una escasa higiene en la maquinaria, o por el poco control con otros animales del lugar, provocando que la diseminación de la bacteria sea fácil (Brito, 2019). Además, la producción intensiva en granjas, el transporte inadecuado de las aves, jalsas con limpieza ineficiente son factores que ayudan a la diseminación de la bacteria (Jang et al., 2019).

Otro punto de contaminación y diseminación de *E.coli* es en el proceso de faenamiento de las aves, principalmente en la fase de evisceración, por lo que cerca del 75% de infecciones en humanos se produce por el consumo de carne de pollo mal cocida. En cuanto a la carne de bovino y porcino existen muchos más reglamentos y controles sanitarios que reducen los niveles de contaminación y peligro para la salud pública, siendo así, la carne de pollo uno de los principales vehículos para *Escherichia coli* (Brito, 2019).

La diseminación de *Escherichia coli* en el ambiente es relativamente sencilla, por el contacto directo con animales o de forma indirecta a través de alimento, agua y residuos de campos agrícolas o granjas (Brito, 2019). Se debe destacar que varios de los antimicrobianos que se emplea en los animales son muy similares a los de medicina humana, por lo que es común que se desarrolle la resistencia cruzada, es decir, bacterias resistentes a fármacos veterinarios lo sean también a antimicrobianos de uso humano (Castro & Schettini, 2020).

1.2.7. Mecanismo moleculares de resistencia de *Escherichia coli*

1.2.7.1. Hidrólisis enzimática: Es el mecanismo de resistencia ante los antibióticos betalactámicos, *Escherichia coli* produce betalactamasas con la capacidad de hidrolizar los enlaces amidas del núcleo de los betalactámicos, provocando la inactivación del antibiótico (Mosquito et al., 2020). Las betalactamasas tienen la capacidad de producir mutaciones en genes estructurales a nivel cromosómico y plasmídico haciendo resistente a *E.coli* incluso a fármacos derivados de betalactámicos (Bernardez, 2019).

Los macrólidos también se ven afectados por la hidrólisis enzimática, debido a la capacidad de la bacteria para formar esterases que van a provocar la hidrólisis del anillo lactona del antibiótico, inhibiendo la acción del antibiótico de forma inmediata (Mosquito et al., 2020).

1.2.7.2. Mutación enzimática de antibióticos: *Escherichia coli* desarrollo resistencia a los aminoglucósidos, a través de la producción de enzimas modificadoras codificadas a nivel de los plásmidos, al alterar a los aminoglucósidos este tiene la incapacidad de bloquear la síntesis de proteínas ya que el fármaco no puede unirse a los ribosomas, de forma que interfiere con el mecanismo de acción de antimicrobiano y por ende la inactiva totalmente (Mosquito et al., 2020).

Las principales enzimas modificadores se alojan en los transposones; fragmentos de ADN con la capacidad de movilizarse en el genoma o entre plásmidos, lo que facilita aún más la resistencia (Bernardez, 2019).

1.2.7.3. Modificaciones en el sitio blanco: *Escherichia coli* puede provocar mutaciones en las proteínas formadoras de la pared celular, alterando así la afinidad de los betalactámicos de forma que estos no puedan inhibir la formación de la pared celular bacteriana. Tiene la capacidad de alterar la secuencia de ARN de las subunidades 30S y 50S, haciendo imposible la unión de los macrólidos y aminoglucósidos a los ribosomas y, por ende, inhiben su acción (Mosquito et al., 2020).

La resistencia a las quinolonas se desencadena por mutaciones a nivel cromosómico, alterando la secuencia cromosomal de la bacteria de forma que el fármaco no es capaz de reconocer el sitio de acción. En cuanto a las tetraciclinas se conoce que las mutaciones impiden que el antibiótico actúe sobre la subunidad 7S a nivel ribosomal, de forma que el fármaco no logra actuar (Mosquito et al., 2020).

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Determinar la antibiorresistencia de cepas de *Escherichia coli* aisladas en carne de pollo en la ciudad de Ambato, provincia Tungurahua.

1.3.2. Objetivos específicos

- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los fármacos en las cepas de *Escherichia coli* resultantes como sensibles.
- Describir los tipos de mecanismos moleculares de resistencia de *Escherichia coli* ante los antibióticos.

1.4. Hipótesis

H0: Las cepas de *Escherichia coli* aisladas en carne de pollo en la ciudad de Ambato, Provincia de Tungurahua no muestran resistencia a los antibióticos empleados en la investigación.

H1: Las cepas de *Escherichia coli* aisladas en carne de pollo en la ciudad de Ambato, Provincia de Tungurahua muestran resistencia a los antibióticos empleados en la investigación.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Ubicación del experimento

El presente estudio tuvo lugar en el Laboratorio de Biología Molecular ubicado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, ubicada en la provincia de Tungurahua, cantón Cevallos como una extensión de 19,000 km², altitud de 2.882 msnm, latitud 1°22'08.7" y longitud 78° 36'23.8".

2.2. Características del lugar

Tabla 2. Características del Cantón Cevallos

| Parámetro | Valor |
|----------------------------------|---------------------------------|
| Clima | Ecuatorial Meso Térmico Seco |
| Temperatura °C | 13-16 |
| Humedad relativa, % | 60-75 |
| Velocidad del viento, m/s | 2.1-8.9 |
| Precipitación, mm | 200-500 |

Fuente: (GAD Cevallos, 2011)

2.3. Equipos y Materiales

Tabla 3. Materiales

| Materiales de Laboratorio | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">• Cajas Petri• Gradillas• Tubos de ensayo• Cucharas de medición• Varilla de agitación• Vasos de precipitación• Papel de Aluminio• Micropipetas• Puntas de micropipetas• Guantes de látex• Imanes• Pinzas | <ul style="list-style-type: none">• Asas de siembra• Palillos de siembra• Mascarilla• Cofia• Zapatones• Mandil• Mecheros bunsen• Cintas testigo• Cubetas para espectrofotómetro• Hisopos Estériles |
| Reactivos | |
| <ul style="list-style-type: none">• Agua destilada• Agar Müller Hilton• Medio líquido Cerebro-Corazón• Alcohol | <ul style="list-style-type: none">• Agar Tripticasa de Soya• Medio líquido Luria Bertani• Discos de Antibióticos |
| Equipos | |
| <ul style="list-style-type: none">• Balanza Analítica FC 2000 (2000 g; 0,01 g)• Autoclave• Incubadora• Espectrofotómetro | <ul style="list-style-type: none">• Agitador magnético con plancha de calentamiento• Nevera• Baño María• Vortex |
| Insumos de Oficina | |
| <ul style="list-style-type: none">• Computadora• Esferos | <ul style="list-style-type: none">• Cámara fotográfica• Cuaderno de apuntes |

-
- Cinta adhesiva
 - Rotulador
 - Impresora
-

2.4. Factores de Estudio

Tabla 4. Discos de Antibióticos

| Fármaco | Simbología | Descripción |
|---------------------------------|-------------------|---|
| Amikacina | AK 30 µg | Aminoglucósido de espectro extendido. Inhibe la síntesis proteica al unirse a la subunidad 30s en los ribosomas de la bacteria. |
| Ceftriaxona | CRO 30 µg | Cefalosporina de tercera generación. Inhibe la formación de la pared bacteriana. |
| Ciprofloxacina | CIP 5 µg | Fluoroquinolona, inhibe la replicación del ADN bacteriano, al no permitir en superenrollamiento del ADN girasa. |
| Amoxicilina + Ácido clavulánico | AMC 30 µg | Betalactámico más inhibidor de betalactamasas. Inhibir la formación de la pared bacteriana y no se ve afectada por las enzimas creadas por las bacterias. |
| Gentamicina | CN 120 µg | Aminoglucósido, impide la síntesis proteica tras su unión a la subunidad 30s del ribosoma bacteriano. |

(Lopardo, 2019)

2.5. Análisis estadístico

2.5.1. Tamaño de la muestra

Se trabajó con un total de 31 muestras identificadas molecularmente de *Escherichia coli*, que se encuentran en conservación en el Laboratorio de Biología Molecular ubicado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.

2.5.2. Diseño experimental

La presente investigación será conducida en 2 fases.

Fase 1: Se determinó la sensibilidad de las cepas de *Escherichia coli* a los diferentes fármacos propuestos, la variable a considerar será la respuesta de Sensibilidad (S) o Resistencia (R) frente a los antimicrobianos evaluados.

Los datos de esta fase al ser variables cualitativas no presentaron una distribución normal ni homogeneidad, por lo que el análisis estadístico se realizó con pruebas no paramétricas aplicando la prueba de Kruskal Wallis complementada con la prueba U de Mann Whitney, empleando el programa SPSS 26.0 utilizando un nivel de significación del 95%.

Fase 2: Las cepas determinadas como sensibles a los diferentes antibióticos resultantes de la fase 1, fueron evaluados para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) con diferentes concentraciones de acuerdo con el fármaco siguiendo las directrices establecidas por la (CLSI, 2023), Clinical & Laboratory Standards

Institute. Esta evaluación se realizará midiendo densidad óptica en el espectrofotómetro (# de bacterias/ml).

Los datos de la fase dos, se tabularon en Microsoft Excel 2016 y se analizó por estadística descriptiva, de forma que los resultados se describieron a través de tablas y gráficos.

2.6. Metodología

Las 31 cepas de *Escherichia coli* molecularmente identificadas anteriormente con las que se trabajó se encuentran conservadas en eppendorfs, etiquetadas y guardadas en gradillas para crioviales y envueltas en papel aluminio a una temperatura adecuada de -20°C en el Laboratorio de Biología Molecular ubicado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato para su posterior procesamiento.

2.6.1. FASE 1. Refrescamiento de cepas de *Escherichia coli* en TS

2.6.1.1. Preparación del Agar Tripticasa de Soya (TM MEDIA)

El Agar Tripticasa de Soya se trata de un medio no selectivo, que promueve el desarrollo y aislamiento varios microorganismos ya sean aerobios, anaerobios facultativos o estrictos. En su composición cuenta con sangre lo cual ayuda al crecimiento de microorganismos exigentes, sus principales compuestos son la peptona de soya (estimulante del crecimiento), cloruro de sodio (equilibrio del balance osmótico) (Britanialab, 2021).

1. Para comenzar se esterilizó los materiales de laboratorio necesarios para la preparación en el autoclave a 120°C.

2. Pesar 38 g del producto en la balanza analítica.
3. Se coloca los 38 g del producto en 1000ml de agua destilada previamente esterilizados en un vaso de precipitación.
4. Se homogeniza la mezcla en el agitador magnético por 10 minutos.
5. Se sube la temperatura del agitador magnético cada 10 minutos partiendo desde 150°C hasta que la mezcla llegue al punto de ebullición.
6. Se trasvasa el agar TS a un frasco de vidrio de borosilicato para llevar al autoclave por 20 minutos a 120°C.
7. Una vez que sale del autoclave, se colocó el contenido en diferentes placas Petri previamente esterilizadas.
8. Se deja que se solidifique el agar por 24h, para proceder a sembrar.
9. Nota: El agar se prepara con anterioridad para no retrasar los avances de la investigación. (TM media, 2022)

2.6.1.2. Siembra de cepas de *Escherichia coli*

1. Se saca los eppendorfs con las bacterias para ambientarlas cerca de un mechero en un cuarto estéril.
2. Con la ayuda de un palillo para siembra se recolecta la bacteria dentro del eppendorf cerca de un mechero para evitar contaminación (Anexo 3).
3. Se coloca la bacteria recolecta en las placas Petri con Agar Tripticasa de soya previamente rotuladas con el número de la cepa y nombre de la bacteria (*E.coli*)
4. Se espera que la gota se seque entre 3-4h y se procede a estriar con la ayuda de una asa (Anexo 3).
5. Se incuba por 24h a 37°C

2.6.2. Siembra de colonias en Caldo Cerebro-Corazón

2.6.2.1. Preparación de Caldo Cerebro-Corazón (TM MEDIA)

Caldo Cerebro Corazón es un medio líquido ricamente nutritivo que estimula el crecimiento de microorganismos poco y muy exigentes. Sus principales componentes de la infusión de cerebro de ternera, corazón de bovino y peptona aportan carbono, nitrógeno, aminoácidos, péptidos y vitaminas para el desarrollo de los microorganismos (Britanialab, 2021).

1. Para comenzar se esterilizó los materiales de laboratorio necesarios para la preparación en el autoclave a 120°C.
2. Pesar 37 g del producto en la balanza analítica
3. Se coloca los 37 g del producto en 1000ml de agua destilada previamente esterilizados en un vaso de precipitación.
4. Se homogeniza la mezcla en el agitador magnético por 10 minutos.
5. Se sube la temperatura del agitador magnético cada 10 minutos partiendo desde 150°C hasta que la mezcla llegue al punto de ebullición.
6. Se trasvasa el caldo cerebro-corazón a un frasco de vidrio de borosilicato para llevar al autoclave por 20 minutos a 120°C.
7. Una vez que sale del auto clave se coloca en baño maría a 55°C por 30 min.
8. Se trasvasa el contenido en tubos de ensayo, previamente esterilizados, etiquetados (nombre de la cepa, #réplica, 3 por cada cepa) y con su tapón correspondiente de igual forma previamente esterilizados.

(TM media, 2022)

2.6.2.2. Siembra de colonias de *E.coli* en Caldo Cerebro Corazón

1. Una vez que han pasado las 24h de incubación de las cepas de *E.coli* previamente sembradas en Agar TS, con la ayuda de una asa de siembra se recolecta entre 5-6 colonias aisladas directo de la placa Petri cerca del mechero.
2. Se coloca las cepas recolectadas dentro de los tubos de ensayo (3 por cada cepa) con caldo cerebro corazón.
3. Se incuba por 3 horas a 37°C.

2.6.3. Siembra de *E.coli* en Müller Hinton para antibiorresistencia

2.6.3.1 Preparación de Agar Müller Hinton (TM MEDIA)

El Agar Müller Hinton es el medio más utilizado para la realización de los métodos de sensibilidad a antimicrobianos y el recomendado por la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Es un medio no selectivo que estimula el desarrollo de varios microorganismos incluso aquellos que son exigentes, en su composición cuenta con infusión de carne, peptona ácida de caseína, almidón, sangre ovina que permite una buena reproductividad lote a lote en las pruebas de sensibilidad (Britanialab, 2021).

1. Para comenzar se esterilizó los materiales de laboratorio necesarios para la preparación en el autoclave a 120°C.
2. Pesar 38 g del producto en la balanza analítica
3. Se coloca los 38 g del producto en 1000ml de agua destilada previamente esterilizados en un vaso de precipitación.
4. Se homogeniza la mezcla en el agitador magnético por 10 minutos.
5. Se sube la temperatura del agitador magnético cada 10 minutos partiendo desde 150°C hasta que la mezcla llegue al punto de ebullición.

6. Se trasvasa el Agar Müller Hinton a un frasco de vidrio de borosilicato para llevar al autoclave por 20 minutos a 120°C.
7. Una vez que sale del auto clave se trasvasa el contenido a diferentes cajas Petri previamente esterilizadas.
8. Se deja que se solidifique el Agar por 24h para proceder a sembrar.
9. Nota: El agar se prepara con anterioridad para no retrasar los avances de la investigación.

(TM media, 2022)

2.6.3.2. Siembra de *E.coli* en agar MH

1. De las cepas inoculadas anteriormente en Caldo Cerebro Corazón con la ayuda de un hisopo (previamente esterilizado), se toma una muestra de la bacteria (escurrir el hisopo en los bordes del tubo, no se debe sobrecargar la muestra).
2. Se procede a estriar con el mismo hisopo inoculado con *E.coli* en las placas con MH previamente etiquetadas con el nombre de la cepa en 3 placas, es decir, se trabaja con tres réplicas por cepa para asegurar resultados.
3. Se deja reposar las placas ya estriadas durante 15 minutos.

(TM media, 2022)

2.6.3.3. Colocación de discos de antibióticos

1. Pasado los 15 minutos de reposo de las placas con MH y *E.coli* estriadas, se procede a colocar los discos de antibióticos en la placa original y las dos réplicas (3 réplicas por cepa previamente preparadas).
2. El disco blanco se coloca en el centro con la ayuda de una pinza previamente esterilizada y los otros 5 disco con antibióticos propuestos (AK,AMC,CN,CIP, CRO) deben ser colocados a una distancia razonable (Entre discos un aproximado de 2cm) (Anexo 3).

3. Se incuban las placas durante 24h a 37°C para su posterior lectura.

(TM media, 2022)

2.6.4. Lectura de resultados

1. La lectura de los halos se hace siguiendo las directrices de la CLSI 2023.

Tabla 5. Halos de antibiorresistencia (mm)

| Siglas | Antibiótico | Sensible | Intermedio | Resistente |
|---------------|---|-----------------|-------------------|-------------------|
| AMC | Amoxicilina + ácido clavulánico 20/10µg | ≥ 18 | 14-17 | ≤ 13 |
| CRO | Ceftriaxona 30 µg | ≥23 | 20-22 | ≤19 |
| CN | Gentamicina 10 µg | ≥16 | 13-15 | ≤12 |
| AK | Amikacina 30 µg | ≥17 | 15-16 | ≤14 |
| CIP | Ciprofloxacina 5 µg | ≥21 | 16-20 | ≤15 |

Fuente: (Manual CLSI, 2023)

2. Las lecturas deben hacerse sobre una superficie oscura (cartulina negra), con una buena luz o con ayuda de una linterna, con una regla para determinar tamaño de los halos (mm) (Anexo 3).

3. De los resultados obtenidos, se sacó una media de las réplicas de cada cepa y todos se debe tener tabulado en Excel (Anexo 1).

2.6.5. Fase 2. Determinar CMI de cepas Sensibles (S) a los antibióticos.

Todas las cepas determinadas como Sensibles (S) en la Fase uno pasan a la Fase dos para establecer la Concentración Mínima Inhibitoria de cada cepa a los antibióticos propuestos (AK,CN, CRO, AMC, CIP), es decir, la dosis más baja en µg/ml que logré inhibir el crecimiento de la bacteria (Britanialab, 2021).

2.6.5.1. Refrescar y sembrar las cepas de *E.coli* en TS

1. Se sigue el mismo procedimiento ya descrito en la primera fase, tanto para la preparación de Agar Tripticasa de Soya como los pasos a seguir para la correcta siembra y estriación de las cepas de *E.coli* determinada como Sensible (S).

(TM media, 2022)

2.6.5.2. Siembra de colonias en Luria Bertani (LB)

2.6.5.2.1 Preparación de Luria Bertani (LB) (TM MEDIA)

El agar Luria Bertani es un medio líquido empleado ampliamente para cepas de *Escherichia coli*, sus principales componentes como la peptona de caseína y el extracto de levadura brindan el ambiente adecuado para la estimulación en el crecimiento del microorganismo, además que, el cloruro de sodio ayuda a mantener el equilibrio osmótico (Britanialab, 2021).

1. Para comenzar se esterilizó los materiales de laboratorio necesarios para la preparación en el autoclave a 120°C.
2. Pesar 25 g del producto en la balanza analítica
3. Se coloca los 25 g del producto en 1000ml de agua destilada previamente esterilizados en un vaso de precipitación.
4. Se homogeniza la mezcla en el agitador magnético por 10 minutos.
5. Se sube la temperatura del agitador magnético cada 10 minutos partiendo desde 150°C hasta que la mezcla llegue al punto de ebullición.
6. Se trasvasa el caldo LB a un frasco de vidrio de borosilicato para llevar al autoclave por 20 minutos a 120°C.
7. Una vez que sale del auto clave se coloca en baño maría a 55°C por 30 min.

8. Se trasvasa el contenido en tubos de ensayo, previamente esterilizados, etiquetados (nombre de la cepa, #réplica, 3 por cada cepa) y con su tapón correspondiente de igual forma previamente esterilizados (Anexo 6).

(TM media, 2022)

2.6.5.2.2. Siembra de colonias en LB

1. De las cepas previamente refrescadas en TS e incubadas por 24h, se toma con la ayuda de una asa de siembra de 5-6 colonias aisladas de *E.coli*.
2. Se homogeniza la muestra en el Vortex hasta lograr la mezcla total de la bacteria en LB.
3. Se toma 1000 μ L con la ayuda de una micropipeta y se coloca el líquido en una cubeta para espectrofotómetro.
4. Se procede a medir la densidad óptica de la muestra en el espectrofotómetro previamente calibrado a 600nm. Se debe lograr una concentración de 0.500 A.
5. En el caso de sobrepasar los 0.500 A se debe colocar más LB en la muestra y volver a homogenizar en el Vortex.
6. En el caso de tener una concentración menor a 0,500 A se debe recoger más colonias de la placa para sembrar en el tubo con LB y volver a homogenizar en el Vortex hasta lograr la concentración requerida.
7. Antes de realizar la preparación con todas las cepas fue necesario realizar una prueba con varias concentraciones de antibióticos para determinar las que se van a emplear.

2.6.5.3 Preparación de diluciones de antibióticos en diferentes concentraciones.

1. Se parte de las concentraciones de cada fármaco determinadas por la CLSI

Tabla 6. Concentración Mínima Inhibitoria ($\mu\text{g /ml}$)

| Siglas | Antibiótico | Sensible | Intermedio | Resistente |
|---------------|---|-----------------|-------------------|-------------------|
| AMC | Amoxicilina + ácido clavulánico 20/10 μg | $\leq 8/4$ | 18/8 | $\geq 32/16$ |
| CRO | Ceftriaxona 30 μg | ≤ 1 | 2 | ≥ 4 |
| CN | Gentamicina 10 μg | ≤ 2 | 4 | ≥ 8 |
| AK | Amikacina 30 μg | ≤ 4 | 8 | ≥ 16 |
| CIP | Ciprofloxacina 5 μg | ≤ 1 | 2 | ≥ 4 |

Fuente: (Manual CLSI, 2023)

2. A partir de la dosis establecida por la CLSI las pruebas se realizaron con dosis por debajo y encima de lo propuesto para determinar 5 dosis representativas que demuestren la curva de inhibición de los fármacos hasta llegar a la CMI. De forma que se establecieron las siguientes baterías de concentraciones:

Tabla 7. Batería de concentraciones de prueba para CMI.

| Antibiótico | Concentraciones ($\mu\text{g /ml}$) |
|--|--|
| Amikacina (AK) | 2 $\mu\text{g /ml}$, 4 $\mu\text{g /ml}$, 6 $\mu\text{g /ml}$, 12 $\mu\text{g /ml}$, 14 $\mu\text{g /ml}$, 16 $\mu\text{g /ml}$, 18 $\mu\text{g /ml}$, 20 $\mu\text{g /ml}$. |
| Ciprofloxacina (CIP) | 0,5 $\mu\text{g /ml}$, 1 $\mu\text{g /ml}$, 3 $\mu\text{g /ml}$, 5 $\mu\text{g /ml}$, 7 $\mu\text{g /ml}$, 9 $\mu\text{g /ml}$, 11 $\mu\text{g /ml}$, 13 $\mu\text{g /ml}$, 15 $\mu\text{g /ml}$, 17 $\mu\text{g /ml}$, 19 $\mu\text{g /ml}$, 21 $\mu\text{g /ml}$. |
| Gentamicina (CN) | 2 $\mu\text{g /ml}$, 4 $\mu\text{g /ml}$, 6 $\mu\text{g /ml}$, 8 $\mu\text{g /ml}$, 10 $\mu\text{g /ml}$, 12 $\mu\text{g /ml}$, 14 $\mu\text{g /ml}$, 16 $\mu\text{g /ml}$, 18 $\mu\text{g /ml}$, 20 $\mu\text{g /ml}$. |
| Ceftriaxona (CRO) | 0,5 $\mu\text{g /ml}$, 1 $\mu\text{g /ml}$, 3 $\mu\text{g /ml}$, 5 $\mu\text{g /ml}$, 7 $\mu\text{g /ml}$, 8 $\mu\text{g /ml}$, 12 $\mu\text{g /ml}$, 14 $\mu\text{g /ml}$, 16 $\mu\text{g /ml}$, 18 $\mu\text{g /ml}$, 20 $\mu\text{g /ml}$, 22 $\mu\text{g /ml}$. |
| Amoxicilina + ácido clavulánico (AMC) | 3 $\mu\text{g /ml}$, 6 $\mu\text{g /ml}$, 8 $\mu\text{g /ml}$, 10 $\mu\text{g /ml}$, 13 $\mu\text{g /ml}$, 16 $\mu\text{g /ml}$, 19 $\mu\text{g /ml}$, 22 $\mu\text{g /ml}$, 25 $\mu\text{g /ml}$, 28 $\mu\text{g /ml}$, 30 $\mu\text{g /ml}$, 33 $\mu\text{g /ml}$. |

3. Dado que es necesario tener las concentraciones en microlitros para poder agregarlas a los tubos con 8 ml de LB, se realizan reglas de 3 de cada antibiótico según su concentración:

Tabla 8. Concentraciones de Prueba en μL .

| Antibiótico | Regla de 3 | Concentraciones (μL) |
|--|---|---|
| Amikacina (AK) | Concentración: 200mg-20ml 200.000 μg - 20.000 μL 16 μg (8ml LBx2 μg)- X | 1.6 μL , 3.2 μL , 4.8 μL ,9,6 μL 11.2 μL ,12.8 μL ,14.4 μL ,16 μL |
| Ciprofloxacina (CIP) | Concentración:200mg-20ml 200.000 μg - 20.000 μL 4 μg (8ml LBx0,5 μg)- X | 0.5 μL , 0.8 μL , 2.4 μL , 4 μL , 5.6 μL , 7.2 μL , 8.8 μL , 10.4 μL , 12 μL , 13,6 μL , 15.2 μL , 16.8 μL |
| Gentamicina (CN) | Concentración: 80 mg-2ml 80.000 μg - 2000 μL 16 μg (8ml LBx2 μg)- X | 0.5 μL , 0.8 μL , 1.2 μL , 1.6 μL , 2 μL , 2.4 μL , 2.8 μL , 3.2 μL , 3.6 μL , 4 μL , 4.4 μL . |
| Ceftriaxona (CRO) | Concentración: 1g-100ml 1.000.000 μg - 100.000 μL 4 μg (8mlLBx0,5 μg)- X | 0,5 μL , 0,8 μL , 2,4 μL , 4 μL , 5.6 μL , 6.4 μL , 9.6 μL , 11.2 μL , 12.8 μL , 14.4 μL , 16 μL , 17.6 μL . |
| Amoxicilina + ácido clavulánico (AMC) | Concentración:1000mg-20ml 1000000 - 20.000 μL 24 μg (8mlLBx3 μg) - X | 0.5 μL , 1 μL , 1.3 μL , 1.6 μL , 2.08 μL , 2.6 μL , 3.04 μL , 3.5 μL , 4 μL , 4.5 μL , 4.8 μL , 5.3 μL |

4. Una vez determinadas las concentraciones en μL , se preparó una batería con cada concentración de antibiótico agregando los μL determinados en cada tubo con 8 ml de LB y se homogeniza la muestra en el Vortex (Anexo 6).
5. De cada tubo con LB+Antibiótico se toma 100 μL con ayuda de una pipeta y se coloca en cada tubo de LB previamente rotulado (nombre de la cepa y número

de réplica, 3 por cada cepa y concentración de antibiótico). Se homogeniza la muestra en el Vortex.

6. Se agrega 100µL con ayuda de la micropipeta de la bacteria ya estandarizada a 0.500 A en el espectrofotómetro en cada tubo con las diferentes concentraciones del antibiótico. Se homogeniza la muestra en el Vortex.
7. Se prepara un tubo de LB+ 100µL de bacteria para control positivo y un tubo de LB+100ML de antibiótico para control negativo y se homogenizan las muestras en el Vortex.
8. Se incuban todas las muestras durante 24h para su posterior lectura.

2.6.5.4 Lectura de resultados

1. Pasa las 24 h de incubación se procede a realizar la lectura en el espectrofotómetro calibrado a 600nm (Anexo 6).
2. Con la ayuda de una micropipeta de toma 1000µL de LB para hacer control blanco y se mide en el espectrofotómetro resultando en 0.000A.
3. Se inicia la lectura de forma ordena por cada cepa, replica (Original, R1,R2) y concentración.
4. Se homogeniza la muestra en el Vortex, y con ayuda de la micropipeta se toma 1000µL de muestra para colocarla en una cubeta de espectrofotómetro y proceder a medir (Anexo 6).
5. Se debe iniciar por el Control Bacteria y luego seguir con la Original, R1 y R2.
6. Se tabulan todos los resultados y se saca una media de las réplicas (Anexo 4).

2.6.5.5. Determinación de concentraciones definitivas.

1. De las pruebas realizadas, se toman 5 concentraciones donde se logre observar claramente la curva de inhibición del antibiótico.

Tabla 9. Batería de Diluciones para CMI

| Fármaco | Concentraciones |
|---------------------------------------|---|
| Amikacina (AK) | 12µg/ml, 14 µg/ml,16 µg/ml,18 µg/ml,20 µg/ml. |
| Ciprofloxacina (CIP) | 13 µg/ml,15 µg/ml,17 µg/ml,19 µg/ml,21 µg/ml. |
| Gentamicina (CN) | 14 µg/ml,16 µg/ml,18 µg/ml,20 µg/ml,22 µg/ml |
| Ceftriaxona (CRO) | 1 µg/ml,5 µg/ml,14 µg/ml,18 µg/ml,22 µg/ml. |
| Amoxicilina + ácido clavulánico (AMC) | 6 µg/ml,10 µg/ml,22 µg/ml,28 µg/ml,33 µg/ml |

2. Con las concentraciones a emplear ya determinadas se realizó el mismo procedimiento ya especificado en los puntos anteriores con cada cepa determinada como Sensible (S) a cada antibiótico.
3. Rotular cada tubo con el nombre de la cepa, el número de repetición (O, R1,R2) con cada concentración. Por cada concentración 3 repeticiones para asegurar los resultados.
4. Se tabuló todos los datos y sacar medias de las repeticiones, para evidenciar curvas de inhibición.

2.7. Variables respuesta

2.7.1. Cualitativa

- **Resistencia a Antibióticos por método Kirby Bauer**

Se considera a las diferentes cepas de *Escherichia coli* como Sensibles (S), Intermedia (I) o Resistente (R), según el tamaño de los halos (mm), siguiendo las directrices de la CLSI.

2.7.2. Cuantitativa

- **Concentración Mínima Inhibitoria**

Se considera como CMI a la dosis del fármaco más bajo expresada en µg/ml capaz de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli*. Se establece por la absorbancia (luz transmitida a través del cultivo), con una longitud de onda de 600 nanómetros.

2.8. Procesamiento de la Información

Los datos recolectados en el presente estudio se registraron en una base de datos en Microsoft Excel ® 2016.

CAPÍTULO III

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este capítulo, se describe los resultados obtenidos en las distintas fases del estudio. En primera instancia los resultados de las mediciones de los halos de inhibición, determinando las cepas Sensibles, Intermedia o Resistentes a los antibióticos, basándonos en el método fenotípico de Kirby Bauer, tomando como directriz a los puntos de corte establecidos según la CLSI 2023 (The Clinical & Laboratory Standards Institute).

3.1 Prueba de sensibilidad a antibióticos (Antibiorresistencia)

De las 31 cepas de *Escherichia coli*, 15 que corresponde al 58,1% fueron multirresistente, principalmente a ciprofloxacina 45,2%, seguido de ceftriaxona con una resistencia del 25,8%, amoxicilina más ácido clavulánico con 9,8%, mientras que tanto amikacina como gentamicina muestran una resistencia del 0% (Figura 2).

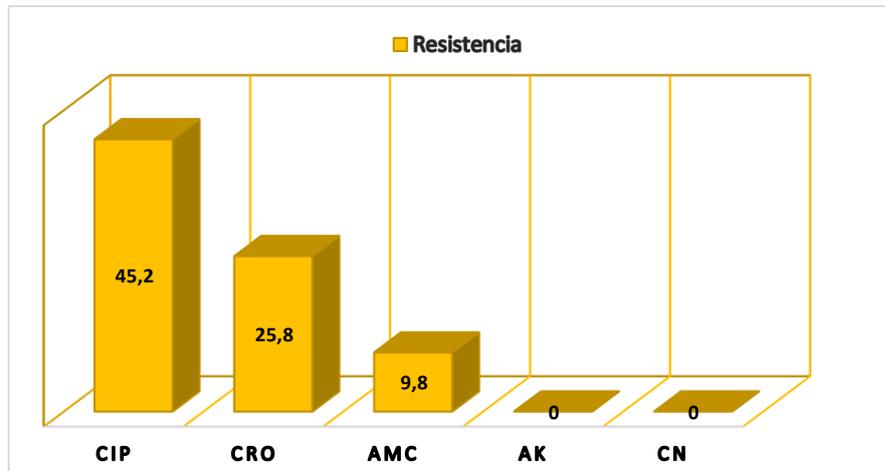


Figura 2. Porcentaje de antibiorresistencia de aislados de *E.coli*

CIP= Ciprofloxacina, CRO= Ceftriaxona, AMC= Amoxicilina
 ácido clavulánico, AK= Amikacina, CN= Gentamicina.

Es importante destacar la resistencia intermedia que presentaron la mayoría de las cepas, esto quiere decir que los antibióticos tienen la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano siempre y cuando se empleen las dosis máximas recomendadas. Amoxicilina + ácido clavulánico presentó la resistencia intermedia más alta 41,2%, seguida de amikacina 25,8%, gentamicina 16%, ceftriaxona 9,7% y finalmente ciprofloxacina con una resistencia intermedia de 3,3% (Figura 3).

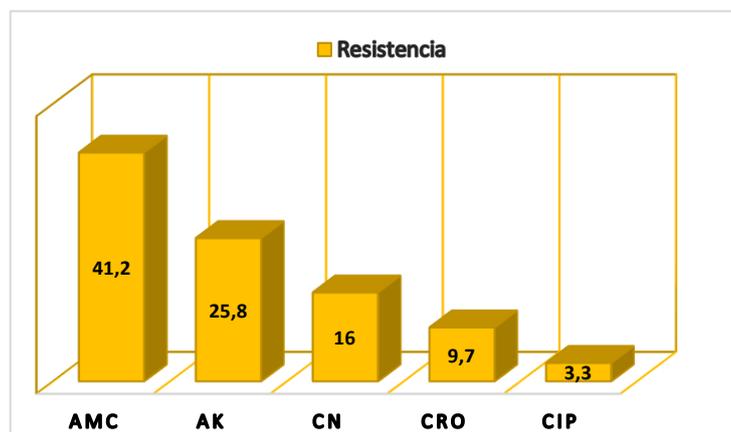


Figura 3. Porcentaje de antibiorresistencia intermedia de aislados de *E.coli*

CIP= Ciprofloxacina, CRO= Ceftriaxona, AMC= Amoxicilina ácido clavulánico, AK= Amikacina, CN= Gentamicina.

En la tabla 10 se describen desde las cepas más sensibles hasta las más resistentes de *Escherichia coli* con las que se trabajó en el estudio, de forma que las cepas más sensibles son aquellos donde la media de la escala se acercan más a 3 mientras que las más resistentes se acercan más hacia el 1. Estadísticamente varias de las cepas no muestran diferencia por lo que se puede describir que las cepas 04P3R1D1E1, EC12 16S, 152-a, EMG2, I1 16S, PD7, PL-AGW6, NIVEDI C53, 182-a son las más sensibles a los 5 antibióticos empleados (AK,CIP,CRO,CN,AMC) mientras que las cepas más resistentes son las 56 y 02P2R1D2E3, destacando que la cepa 56 es la que muestra una resistencia mucho más marcada a todos los antibióticos empleados.

Para la realización de esta estadística, se emplearon los datos recolectados en la primera Fase del trabajo investigativo, donde a través del método Kirby Bauer se realizaron medias del tamaño de los halos de las 3 réplicas de cada cepa, basándose en los puntos de corte según la CLSI 2023 (The Clinical & Laboratory Standards Institute). AK (S: \geq 17, I:15-16, R: \leq 14), CIP (S: \geq 21, I: 16-20, R: \leq 15), CN (S: \geq 16, I: 13-15, R: \leq 12),CRO(S: \geq 23, I: 20-22, R: \leq 19), AMC (S: \geq 18, I: 14-17, R: \leq 13).

Tabla 10. Sensibilidad *in vitro* de cepas de *Escherichia coli* aisladas de carne de pollo frente a cinco antibióticos (Amikacina, Ciprofloxacina, Ceftriaxona, Gentamicina, Amoxicilina + Acido clavulánico)

| Cepas de <i>Escherichia coli</i> | Sensibilidad <i>in vitro</i> Rangos promedios | Media de la escala 1 R\leftrightarrow 3S |
|---|--|--|
| 04P3R1D1E1 | 315,5 a | 3 |
| EC12 16S | 315,5 a | 3 |
| 152-a | 315,5 a | 3 |
| EMG2 | 315,5 a | 3 |
| I1 16S | 315,5 a | 3 |
| PD7 | 315,5 a | 3 |
| PL-AGW6 | 315,5 a | 3 |
| NIVEDI C53 | 315,5 a | 3 |
| 182-a | 315,5 a | 3 |
| LP5-1 | 276,8 ab | 2,8 |
| SFSA62 16S | 276,8 ab | 2,8 |
| 147-b rosa | 260,3 abc | 2,6 |
| Gut01 | 260,3 abc | 2,6 |
| EC12 | 260,3 abc | 2,6 |
| CUMB SAM - 54 | 238,1 abcd | 2,6 |
| EGE 4460185-59 | 221,6 abcde | 2,4 |
| UTI1958 16S | 221,6 abcde | 2,4 |
| DSM 30083 | 199,4 bcde | 2,4 |
| EC204A1 | 199,4 bcde | 2,4 |
| AF1 | 182,9 cde | 2,2 |
| 54 | 182,9 cde | 2,2 |
| 84SDN19 | 182,9 cde | 2,2 |
| 43-a | 166,4 cde | 2 |
| CVM N56338 | 166,4 cde | 2 |
| OP18 | 166,4 cde | 2 |
| 211 | 166,4 cde | 2 |
| PRO3 | 166,4 cde | 2 |
| ASBY05 | 166,4 cde | 2 |
| SA120 | 160,7 de | 2,2 |
| 02P2R1D2E3 | 149,9 ef | 1.8 |
| 56 | 111,2 f | 1.6 |

Cepas de *Escherichia coli* que en una misma columna comparten letras, no difieren estadísticamente según la prueba de Kruskal Wallis complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$

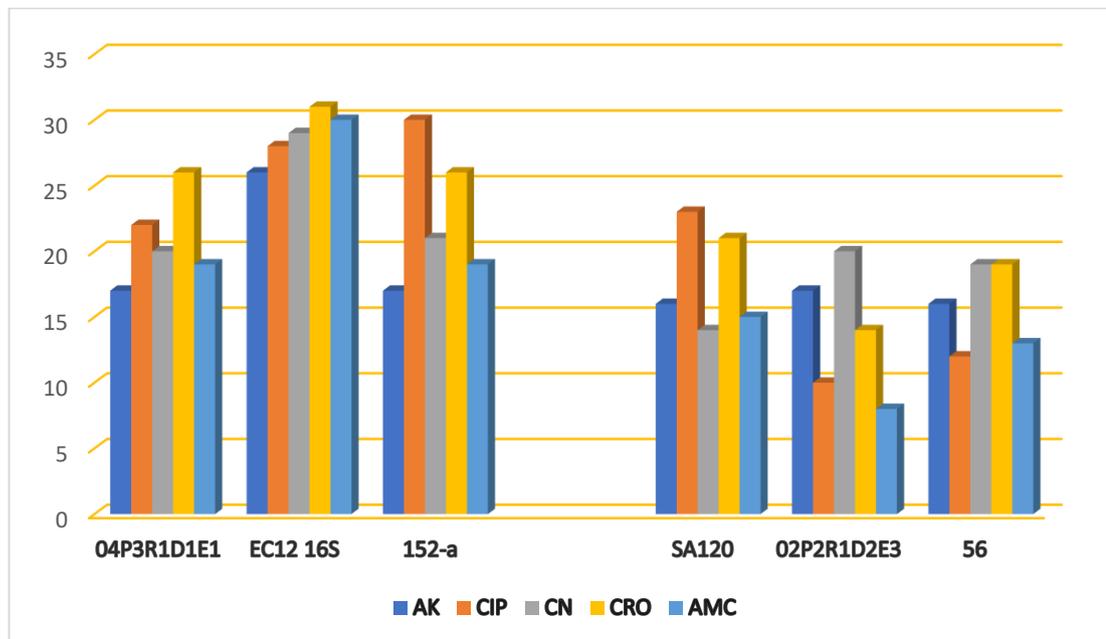


Figura 4. Media de cepas de *E.coli* más sensibles y resistentes a los 5 antibióticos

AK (S: ≥ 17 , I: 15-16, R: ≤ 14), CIP (S: ≥ 21 , I: 16-20, R: ≤ 15),
 CN (S: ≥ 16 , I: 13-15, R: ≤ 12), CRO (S: ≥ 23 , I: 20-22, R: ≤ 19),
 AMC (S: ≥ 18 , I: 14-17, R: ≤ 13).

En la figura 4, se profundiza más en los resultados dado que estadísticamente la diferencia entre estas no es significativa, sin embargo, al ejemplificarlo en un gráfico de barras se puede observar claramente el contraste entre las cepas más sensibles en comparación a aquellas más resistentes e incluso entre esta, se observan diferencias significativas. Los resultados obtenidos en la primera fase de la investigación se ven sustentados por el estudio realizado por Carvajal et al. (2019) que trabajó con 46 cepas de *Escherichia coli* frente a 18 antibióticos, obteniendo resultados de 91% resistentes a betalactámicos, cefalosporinas 1era generación 100%, 2da generación 96%, 3era generación 82%, cuarta generación 84%, aminoglucósidos 43% y fluoroquinolonas 64%, coincidiendo con la presente investigación donde los aminoglucósidos fueron los

más efectivos para inhibir el crecimiento de *Escherichia coli*, mientras que se observó una marcada resistencia a betalactámicos pero se estableció un perfil de resistencia más marcado en las fluoroquinolonas, al contrario que en la investigación de Carvajal et al. (2019) quien determinó como los fármacos menos efectivos a los betalactámicos.

En el caso de la investigación se empleó una cefalosporina de tercera generación (Ceftriaxona) y amoxicilina + ácido clavulánico a diferencia de Carvajal et al. (2019) donde no se emplearon inhibidores de betalactamasas, lo que se considera un factor fundamental en la diferencia de resultados, puesto que *E.coli* inhibe a esta familia de antibióticos por betalactamasas con gran prevalencia en los estudios, en el caso de ceftriaxona se observa que en los resultados de Carvajal et al. (2019) se obtiene el menor porcentaje de resistencia en las cefalosporinas de tercera generación al igual que en este estudio.

Vinueza-Burgos et al. (2019) concuerda con los resultados descritos en la fase uno donde los aminoglucósidos son la familia antibiótica de mayor eficacia, sobre los betalactámicos a pesar de analizar fármacos con inhibidores de betalactamasas y por último se encuentran las fluoroquinolonas con una marcada resistencia por parte de *Escherichia coli*. En su estudio se trabajó con 176 aislados de *E.coli* donde se mostró una resistencia a betalactámicos de 64,3%, aminoglucósidos 47,3% y ciprofloxacina del 72,2%. En el trabajo investigativo de Velásquez (2023) también se describe un resistencia a ciprofloxacina (65,3%) mucho más marcada en comparación a los otros antibióticos del estudio, mientras que los aminoglucósidos presentaron apenas 4,5% de resistencia.

En ambos estudios al igual que en este trabajo investigativo los aminoglucósidos se determinan como los fármacos más eficaces y esto se relaciona principalmente a su mecanismo de acción y que *E.coli* presenta menos mecanismos de evasión o inhibición en comparación a las fluoroquinolonas y los betalactámicos que al ser mucho más empleados en la terapéutica diaria e incluso de forma empírica desarrollan mayor predisposición a la resistencia, también se destaca que los aminoglucósidos son

empleados con mayor seguridad y cautela principalmente por sus efectos secundarios (ototoxicidad y nefrotoxicidad) lo que hace que se empleen mucho menos como fármacos profilácticos o en dosis inadecuadas, reduciendo el desarrollo de resistencia a su acción.

En la tabla 11 se realiza un análisis estadístico donde se determinó el fármaco más eficaz para inhibir el crecimiento a las cepas de *Escherichia coli* estudiadas en el presente trabajo investigativo y el fármaco menos efectivo ante las cepas de *E.coli*, de forma que se establece como el antibiótico más efectivo es Gentamicina con una media de escala de 2.84 de efectividad, estadísticamente se considera igual de eficiente a Amikacina con un media 2,74 al encontrarse más cercanas (mientras la media se encuentre más cercana al 3 más sensible es) y el antibiótico con la menor capacidad de inhibir a las cepas de *Escherichia coli* es Ciprofloxacina con una media de 2,06 que estadísticamente difiere completamente con el resto de antibióticos empleados en la investigación.

Tabla 11. Efectividad de cinco antibióticos (Amikacina, Ciprofloxacina, Gentamicina, Ceftriaxona Amoxicilina + Acido clavulánico) mediante ensayo de sensibilidad *in vitro* de cepas de *Escherichia coli* aisladas de carne de pollo.

| Antibiótico | Sensibilidad <i>in vitro</i> Rangos promedios | Media de la escala |
|---------------------------------|--|--------------------|
| Amikacina | 265,18 a | 2,74 |
| Ciprofloxacina | 183,89 c | 2,06 |
| Gentamicina | 284,05 a | 2,84 |
| Ceftriaxona | 225,02 b | 2,39 |
| Amoxicilina + Acido clavulánico | 206,87 b | 2,39 |

Antibióticos que en una misma columna compartan letras, no difieren estadísticamente según la prueba de Kruskal Wallis complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$.

En la figura 5 se establece de forma más clara el porcentaje total de cepas que se determinaron como sensibles al grupo de antibióticos dentro de la investigación (AK,CN,CIP,AMC,CRO) de forma que se determina que el 84% (26/31) de cepas son sensibles a Gentamicina mientras que, el fármaco menos efectivo fue Ciprofloxacina con 48,4 (15/31).

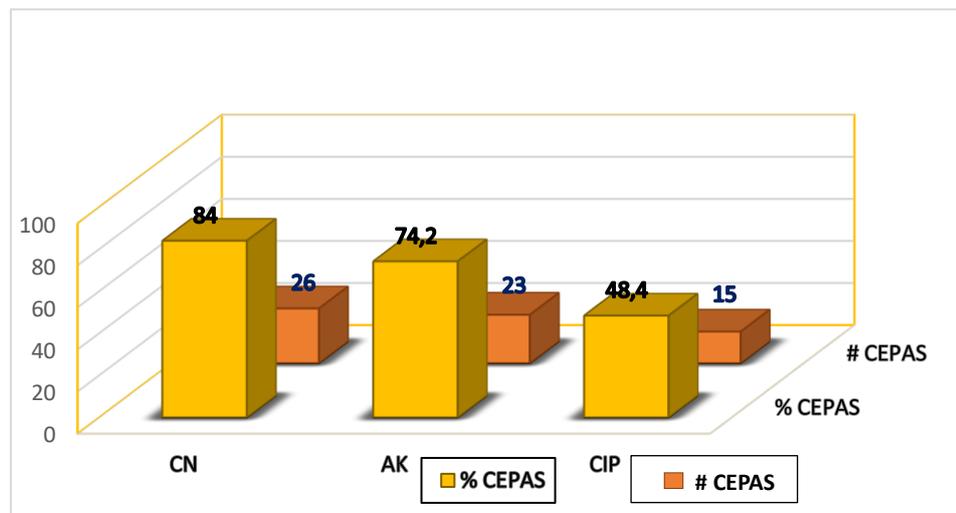


Figura 5. Porcentaje y número de cepas sensibles a CN,AK,CIP

Mendieta et al. (2021) en su estudio determinó que el fármaco más efectivo para tratar infecciones con *Escherichia coli* fue Gentamicina con una efectividad de 79,31% sobre los otros antibióticos puestos a prueba, se analizó también la efectividad de amikacina con 70,68% que forma parte de los aminoglucósidos al igual que gentamicina, mientras que las fluoroquinolonas analizadas en la investigación como ciprofloxacina mostraron una eficacia significativamente baja del 32%; Mendieta et al. (2021) justifica estos resultados ya que las fluoroquinolonas son la primera en los tratamientos de infecciones bacterianas principalmente de forma empírica, lo que provoca que la bacteria tenga la posibilidad de crear métodos de evasión a los mecanismos de acción del fármaco y dada la facilidad de transmitir esta resistencia a otras cepas de *E.coli*,

tiene total sentido que los mecanismos de resistencia estén dejando obsoletas a las fluoroquinolonas.

La mayor efectividad de Gentamicina sobre Amikacina a pesar de ser antibióticos de la misma familia (aminoglucósidos) se relaciona con el mecanismo de acción, ambos antibióticos van a inhibir la síntesis de proteínas a nivel ribosomal (Bello, 2023), sin embargo, Gentamicina actúa inhibiendo la síntesis desde el inicio de forma que al unirse al grupo amino bacteriano no permite que se inicie con el proceso bloqueándolo desde el principio, además que, presenta un efecto postantibiótico más prolongado en comparación a Amikacina que actúa inhibiendo la síntesis proteica inhibiendo la fase de traducción de igual forma uniéndose al grupo amino e hidroxilo, provocando una traducción errónea y bloqueando la síntesis, sin embargo actúa sobre un proceso ya iniciado lo que puede provocar que los mecanismos de resistencia bacteriano pueden actuar inhibiendo la acción farmacológica de amikacina, además, el efecto post antibiótico de amikacina es casi nulo (Lopardo, 2019), lo que respalda a Gentamicina como el más efectivo en esta y otras investigaciones.

Estos resultados son similares a los descritos en el presente trabajo investigativo al igual que en el estudio realizado por Medina (2021) que sustenta los resultados en su investigación ya que obtuvo una sensibilidad en los aminoglucósidos del 53% mientras que las quinolonas y fluoroquinolonas se establecieron por debajo del 20%, en el caso de la presente investigación se obtuvo una sensibilidad gentamicina del 84% y en el otro extremo ciprofloxacina con 48,4%, coincidiendo con los autores ya descritos en que la resistencia a ciprofloxacina se provoca por el uso indiscriminado del fármaco, de forma empírica o profiláctica, sin respetar las dosis adecuadas y debido a su amplio espectro empleándose como primera línea en la mayoría de infecciones por lo que tiene lógica que las bacterias entre las que se destaca *E.coli* tengan la posibilidad de mejorar cada vez más sus mecanismos de resistencia haciendo cada vez más corta la lista de antibióticos efectivos contra el microorganismo.

En el caso de los aminoglucósidos que todas las investigaciones concuerdan en que son los más efectivos, incluso en el estudio de Rojas et al. (2019) donde Gentamicina mostro una eficacia del 82% y Amikacina del 100% sobre los otros grupos de antibióticos estudiados. Se considera que el éxito de los aminoglucósidos se debe a que no son empleados como primera línea de acción ante infecciones, principalmente debido a sus efectos nefrotóxicos y ototóxicos por lo que se limita su uso, y generalmente se emplean con un antibiograma de respaldo y a dosis adecuadas por lo que es lógico que *Escherichia coli* no tenga bien desarrollado sus mecanismo de resistencia.

En cuanto a las diferencias en la eficacia entre amikacina y gentamicina a pesar de ser de la misma familia de antibiótico, Sánchez (2021) describe que la principal enzima que actúa contra Gentamicina es ANT (nucleotidiltransferasa) mientras que la enzima encargada de inhibir la acción de Amikacina es ACC (N-acetiltransferasas), por lo que los resultados pueden variar entre estos fármacos en distintas investigaciones ya que depende de la enzima que la cepa bacteriana presente para determinar la menor o mayor resistencia a cada fármaco, sin embargo, en todas las investigaciones citadas y en el estudio presente se determina que los aminoglucósidos siguen estando por encima de la media en cuanto a su eficiencia para inhibir los mecanismo de resistencia de *E.coli* y lograr ejercer su acción farmacológica.

3.2 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Los resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria serán descritos para cada fármaco, estableciendo las dosis más bajas para inhibir el crecimiento de las bacterias por parte de los fármacos en estudio: Amikacina, Gentamicina, Amoxicilina + ácido clavulánico, Ceftriaxona, Ciprofloxacina. El método empleado se realizó por diluciones seriadas con diferentes concentraciones de los fármacos partiendo desde los puntos de corte establecidos según la CLSI 2023 (The Clinical & Laboratory Standards Institute).

De las 31 cepas de *Escherichia coli* con las que se trabajó en la fase uno de la presente investigación, se establecieron las cepas resultantes como Sensibles (S), 26 cepas fueron sensibles a gentamicina, 23 a amikacina, 20 a ceftriaxona, 16 a amoxicilina + ácido clavulánico y 15 a ciprofloxacina (Figura 6) con las cuales se trabajó en la segunda fase con la finalidad de determinar las CMI de cada cepa y establecer un análisis descriptivo de las curvas de crecimiento.

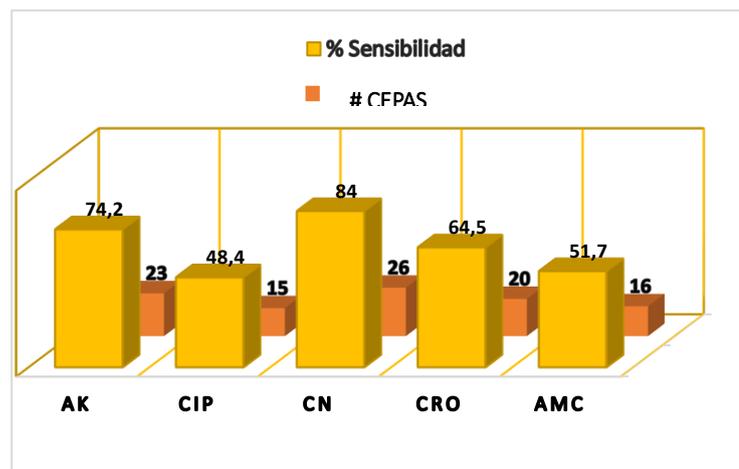


Figura 6. Porcentaje y número de cepas sensibles a los 5 antibióticos

AK= Amikacina, CIP=Ciprofloxacina, CN=Gentamicina,

CRO=Ceftriaxona, AMC=Amoxicilina+ ácido clavulánico

Para la determinación de CMI de los distintos fármacos empleados en el trabajo investigativo, en primera instancia se realizaron pruebas con una amplia batería de concentraciones de cada fármaco para determinar las concentraciones en las que se iba a trabajar con cada antibiótico tomando como referencia los puntos de corte de la CLSI 2023 ((The Clinical & Laboratory Standards Institute). El punto de esta fase del estudio era determinar la curva de inhibición que presentaban los fármacos para actuar sobre las distintas cepas de *Escherichia coli* y determinar la dosis efectiva en la que se logra la inhibición del crecimiento bacteriano.

El método empleado para determinar las curvas de inhibición fue la medición a través de densidad óptica con la ayuda del espectrofotómetro con una longitud de onda de

600nm, donde se midió la absorbancia de cada concentración y sus repeticiones (O,R1,R2) del antibiótico hasta llegar a la media más cercana a 0.000A determinando así la CMI, a través de una media de cada concentración, un factor fenotípico importante fue la turbidez de cada concentración de forma que mientras menor era la turbidez mayor fue la eficacia de la concentración estudiada (Anexo 6).

3.2.1. CMI de Amikacina (AK)

Según CLSI (2023), la CMI de AK es 4µg/ml.

- Concentraciones probadas: 2 µg/ml, 4 µg/ml,6 µg/ml,12 µg/ml,14 µg/ml,16 µg/ml,18 µg/ml,20 µg/ml. (Figura 7).

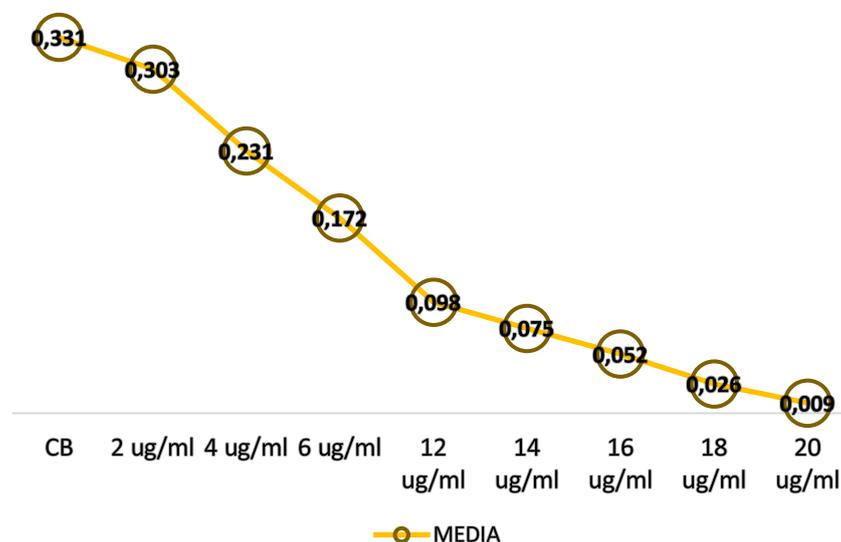


Figura 7. Curva de Inhibición de prueba para AK

- Una vez realizada la primera prueba con una batería extensa de concentraciones del fármaco se decidió trabajar con: 12 µg/ml,14 µg/ml,16 µg/ml,18 µg/ml,20 µg/ml, con las 23 cepas de *E.coli* sensibles al fármaco (resultado arrojado de la fase1).

Se determinó resultados a través de una media de las 3 réplicas de cada concentración.

En la figura 8 se describe la cepa con mayor sensibilidad (DSM 30083) mostrando una absorbancia de 0.002 A, logrando la CMI en 20µg/ml, también se observa una gran inhibición y disminución significativa de la turbidez a una dosis de 18 µg/ml. Mientras que la cepa EC12 se muestra como la menor sensibilidad de forma que en la CMI de 20 µg/ml se estableció una absorbancia de 0,008 A. Se destaca que inclusive entre cepas sometidas a un mismo fármaco y a una misma concentración se presenta diferencias significativas en las medias, demostrando el comportamiento cambiante de *Escherichia coli*.

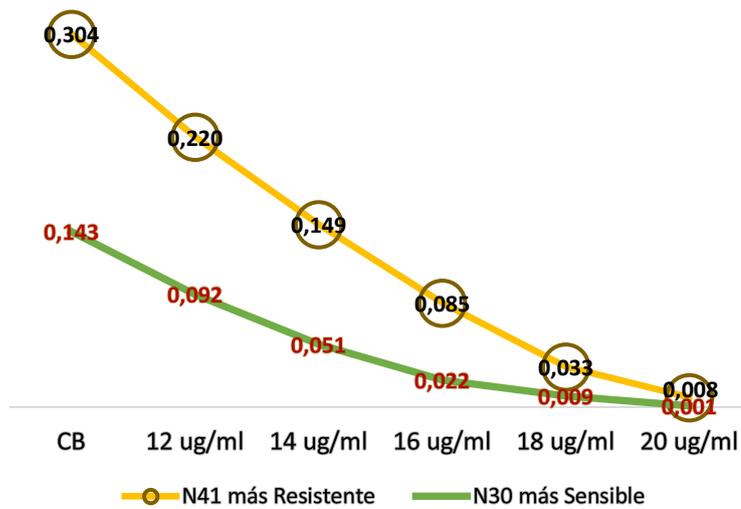


Figura 8. Curva de inhibición más y menos sensible a AK

3.2.2 CMI de Gentamicina (CN)

Según CLSI (2023) la CMI de CN es 2 µg/ml

- Concentraciones probadas: 2 µg/ml, 4 µg/ml, 6 µg/ml, 8 µg/ml, 10 µg/ml, 12 µg/ml, 14 µg/ml, 16 µg/ml, 18 µg/ml, 20 µg/ml (Figura 9).

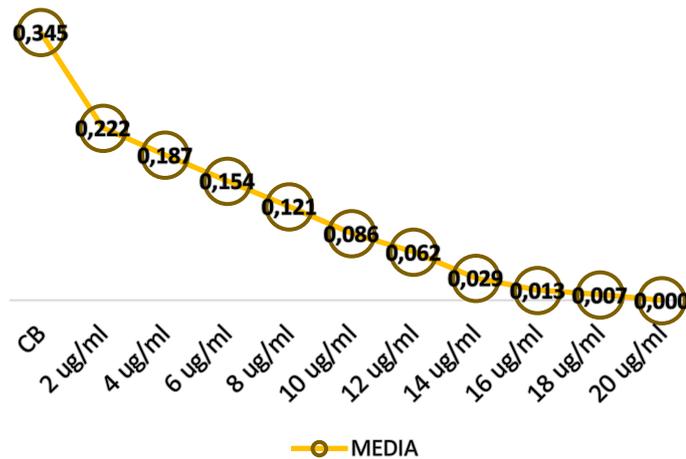


Figura 9. Curva de inhibición de prueba para CN

- Una vez realizada la primera prueba con una batería extensa de concentraciones del fármaco se decidió trabajar con: 14 µg/ml, 16 µg/ml, 18 µg/ml, 20 µg/ml, 22 µg/ml con las 26 cepas de *E.coli* sensibles al fármaco (resultado arrojado de la fase1). Se determinó resultados a través de una media de las 3 réplicas de cada concentración.

En la figura 10 se muestra las curvas decrecientes más significativas para Gentamicina, de forma que la cepa EC204A1 muestra una menor sensibilidad al fármaco logrando la absorbancia más baja en 0.002 A con una curva significativa entre cada concentración, mientras que la cepa con mayor sensibilidad es 02P2R1D2E3 logrando una absorbancia de 0,000 A, estos resultados se lograron en las dosis más altas empleadas en el trabajo investigativo, es decir, CMI= 22 µg/ml. Sin embargo, hay que destacar que en dosis de 20 µg/ml ya se observó absorbancias bajas con una media de 0,003 A considerando que se logra una óptima inhibición del crecimiento bacteriano (Anexo 5).

Gentamicina es el fármaco que muestra curvas más pequeñas de inhibición, logrando desde las dosis más bajas un bloqueo significativo en el crecimiento bacteriano, este resultado se correlaciona con los arrojados en la FASE1 donde CN fue el fármaco de mayor acción contra las cepas de *Escherichia coli*.

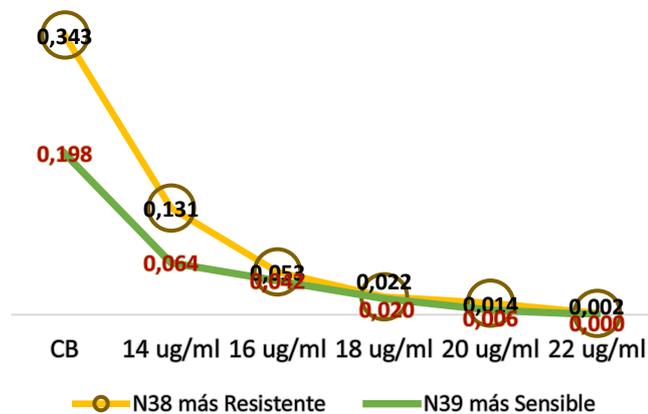


Figura 10. Curva de Inhibición más y menos sensible a CN

Los aminoglucósidos presentan un espectro de acción hacia gram positivos y gram negativos, principalmente actúan contra enterobacterias, son antibióticos bactericidas dependiendo de la concentración del fármaco. Los aminoglucósidos también son capaces de hacer sinergia con otras familias como los betalactámicos aumentando su eficacia contra bacterias (Lopardo, 2019).

La eficacia de los aminoglucósidos para inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* se basa en la inhibición de la síntesis proteica a través de la unión con el ARNr 16S de la subunidad 30S, cada miembro de la familia presenta un sitio blanco de unión diferente pero todos modifican y provocan alteraciones en la traducción de forma que se produce una mala lectura y la síntesis proteica es errónea, esto hace que los mismos aminoácidos bacterianos dañen la membrana celular, ribosomas e incluso aminoglucósidos como Gentamicina actúa inhibiendo el inicio de la síntesis proteica

de forma que no permite la traducción, por ende es más fácil la acción del fármaco y se logra un efecto postantibiótico más prolongado (Lopardo, 2019).

Los aminoglucósidos alteran la fase de traducción, al formar complejos irreversibles entre los grupos amino e hidroxilos, esto facilita la unión del fármaco al sitio diana de codificación en los ribosomas, específicamente en ARNm de la subunidad 30S, esto desencadena un inadecuado transporte del ARNm común, traduciendo proteínas no funcionales y promoviendo la lisis de la bacteria (Estrada et al., 2022).

Estrada et al. (2022) en su estudio analizó la eficacia de los aminoglucósidos sobre cepas de *Escherichia coli* y determinó la CMI (concentración mínima inhibitoria) sobre los aislados, en sus resultados determinó que existe diferencias en las CMI entre las diferentes cepas, sin embargo, estableció que el 70% de cepas fueron inhibidas en 20 µg/ml-22 µg/ml bajo la acción de Amikacina mientras que en el caso de Gentamicina y Tobramicina se determinó una CMI en el 95% de aislados de 18-20 µg/ml. Estos resultados se sustentan con los resultados obtenidos en el presente trabajo investigativo donde la CMI se logra entre 18-22 µg/ml, de igual forma se observó diferencias significativas entre las cepas del estudio y se determina que la razón de esto es que cada cepa presenta una curva exponencial de crecimiento diferente, además que pueden presentar diferentes mecanismo de resistencia al mismo antibiótico, pudiendo ser más o menos efectivos.

Según la CLSI (The Clinical & Laboratory Standards Institute) (2023), las CMI establecidas para amikacina y gentamicina son 4 µg/ml y 2 µg/ml respectivamente, dosis extremadamente bajas en comparación a las descritas por Estrada et al. (2022) y en la presente trabajo investigativo, esto puede deberse a distintas causas entre las que se destaca el comportamiento cambiante de *E.coli*, la alta tasa de crecimiento en la resistencia a nivel mundial de las bacterias principalmente por el uso de los fármacos de forma indiscriminada y sin control. A pesar de estas diferencias significativas entre las investigaciones se determinó a los aminoglucósidos con una eficacia relativamente alta ya que, a pesar del empleo de dosis altas, son estos fármacos los que lograron

inhibir a un mayor porcentajes de aislados de *E.coli*, en esta investigación se bloqueó el crecimiento del 74-84% , (Estrada et al., (2022) determinó una sensibilidad del 70-95% de las cepas estudiadas.

Estos resultados también se ven sustentados por Bullón & Vasquez (2021) que al realizaron un análisis investigativo en más de 237 Tesis realizadas en el periodo de 2010-2020 determinaron que la principal bacteria de estudio fue *Escherichia coli* (96,2%), se describen varias familias de antibióticos que se pusieron a prueba, pero se destaca que se encontró una mayor eficacia por parte de los aminoglucósidos del 72-94%, niveles de eficacia que concuerdan con Estrada et al. (2022) y el presente trabajo, donde los aminoglucósidos siempre han mostrado una eficacia por encima del 70%.

3.2.3. CMI de Ciprofloxacina (CIP)

Según CLSI (2023) la CMI de CIP es 1 µg/ml

- Concentraciones probadas: 0,5µg/ml, 1µg/ml, 3µg/ml, 5µg/ml, 7µg/ml, 9µg/ml, 11µg/ml, 13µg/ml, 15µg/ml, 17µg/ml, 19µg/ml, 21µg/ml (Figura 11).

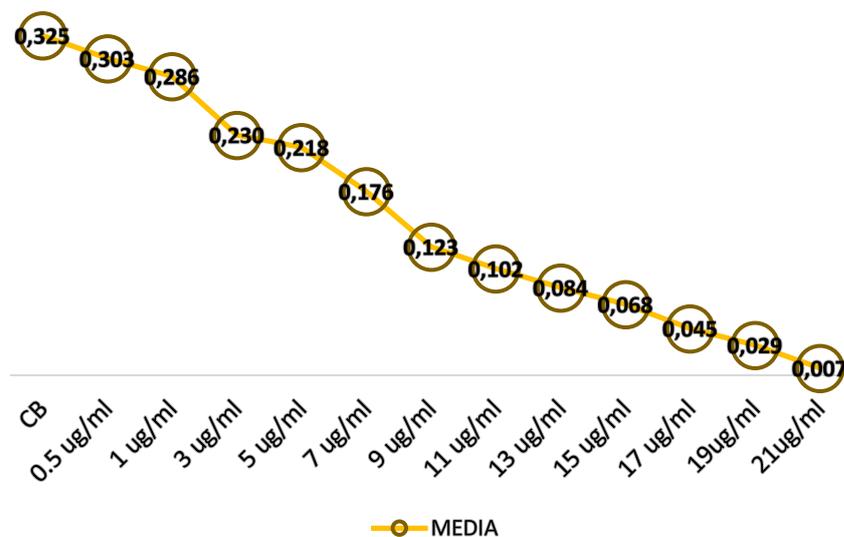


Figura 11. Curva de Inhibición de prueba para CIP

- Una vez realizada la primera prueba con una batería extensa de concentraciones del fármaco se decidió trabajar con: 13µg/ml, 15µg/ml, 17µg/ml, 19µg/ml, 21µg/ml con las 16 cepas de *E.coli* sensibles al fármaco (resultado arrojado de la fase1). Se determinó resultados a través de una media de las 3 réplicas de cada concentración.

En la figura 12 se muestra las curvas más significativas dentro del estudio de ciprofloxacina, de forma que la cepa con mayor sensibilidad es la 04P3R1D1E1 mostrando una curva decreciente bastante baja llegando a la CMI a 21 µg/ml con una absorbancia de 0,001 A. En cuanto la cepa que mostró una menor sensibilidad fue 152- a en la cual se muestra una curva mucho más resistente llegando a la dosis máxima de 21 µg/ml con una absorbancia de 0,012 A.

Se destaca que la mayoría de las cepas de *E.coli* determinadas como sensibles a CIP muestran curvas decrecientes no tan pronunciadas de forma que la absorbancia entre concentraciones varia muy poco, logrando su inhibición en las dosis más altas establecidas con una media de absorbancia más baja en 0,009 A, esto de correlaciona con los resultados de la FASE1 donde ciprofloxacina fue el antibiótico menos efectivo contra los aislados de *Escherichia coli* estudiados en la investigación.

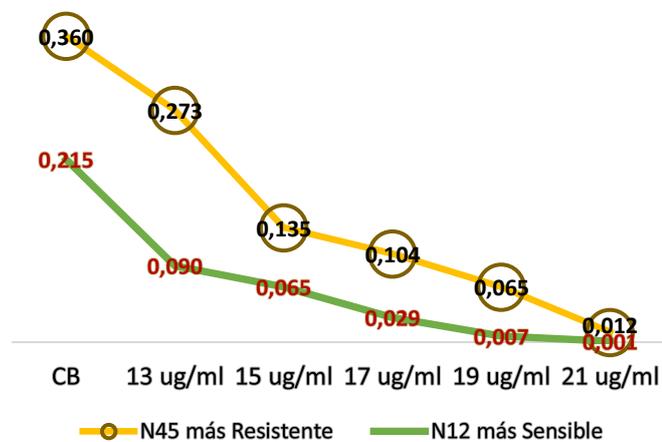


Figura 12. Curva de Inhibición más y menos sensible a CIP

Ciprofloxacina es una fluoroquinolona con un espectro de acción bastante amplio empleada incluso en infecciones muy complicadas, el mecanismo de acción por la que ciprofloxacina puede inhibir a *Escherichia coli* es a través del bloqueo de las enzimas Topoisomerasas las cuales son esenciales en la replicación, transcripción y reparación de ADN bacteriano. Las topoisomerasas inhibidas por ciprofloxacina son ADN girasa y topoisomerasa IV que en condiciones normales participan en el desenrollamiento del ADN indispensable para la división celular de forma que, al encontrarse bloqueadas, no se logra completar el proceso y se promueve la lisis bacteriana (Calvo & Martínez, 2019).

Ciprofloxacina presenta la capacidad de atravesar la membrana bacteriana a través de las porinas o por difusión simple y se conoce que este fármaco presenta una mayor acción sobre la Topoisomerasa IV y algo que debe destacarse es que la inactivación de bacterias gram negativas como *E.coli* se da principalmente gracias a la inhibición de la enzima ADN girasa mientras que son los gram positivos quienes se ven más afectados ante la inhibición de la Topoisomerasa IV (Lopardo, 2019).

El hecho de que Ciprofloxacina inhiba principalmente las Topoisomerasa IV se puede relacionar con la necesidad de emplear dosis altas para lograr la inhibición en el crecimiento de *E.coli*, como se describe en el presente trabajo la CMI entre 19-21 µg/ml, resultados que difieren considerablemente con CLSI (2023), donde se determina que la CMI 1 µg/ml. Los resultados de la presente investigación también se sustentan en que debido al conocido espectro de acción de Ciprofloxacina es ampliamente empleada de forma empírica permitiendo que las bacteria creen resistencias marcadas al fármaco por ende es necesario emplear dosis cada vez más altas para lograr la inhibición en el crecimiento de las distintas cepas.

Núñez et al. (2022) en su investigación determinó una CMI para Ciprofloxacina de 16-28 µg/ml a través de una media entre las diferentes cepas que fueron estudiadas, sin embargo también se determinó que la cepa 2 de *Escherichia coli* fue inhibida a una concentración de 1.4 µg/ml, en este caso Núñez et al. (2022) determina que esto se debe a que no todas las cepas van a mostrar el mismo comportamiento o los mismos

mecanismos de resistencia ante los antibióticos de forma que existirán aislados de *E.coli* en los que los mecanismos de resistencia estén mucho más desarrollados y por ende se necesitará dosis más altas para llegar a la CMI y de igual forma se presentaran cepas mucho más sensibles a las diferentes familias de antibióticos logrando la CMI a dosis mucho más bajas.

En la investigación de (Vaz, 2022) se lograron CMI para ciprofloxacina en una media de 1.8 µg/ml,- 6,8 µg/ml, valores que se encuentran más cerca de los especificados por CLSI (2023) y con una diferencia significativa de los resultados de la presente investigación y también los de Núñez et al. (2022), determinando así el comportamiento cambiante de *Escherichia coli* y la capacidad de que existan mecanismo de resistencia más o menos marcados entre diferentes cepas bacterianas.

3.2.4. CMI de Ceftriaxona (CRO)

Según CLSI (2023) la CMI de CRO es 1 µg/ml

- Concentraciones probadas: 0,5µg/ml, 1µg/ml, 3µg/ml, 5µg/ml, 7µg/ml, 8µg/ml, 12µg/ml, 14µg/ml, 16µg/ml, 18µg/ml, 20µg/ml, 22µg/ml (Figura 13).

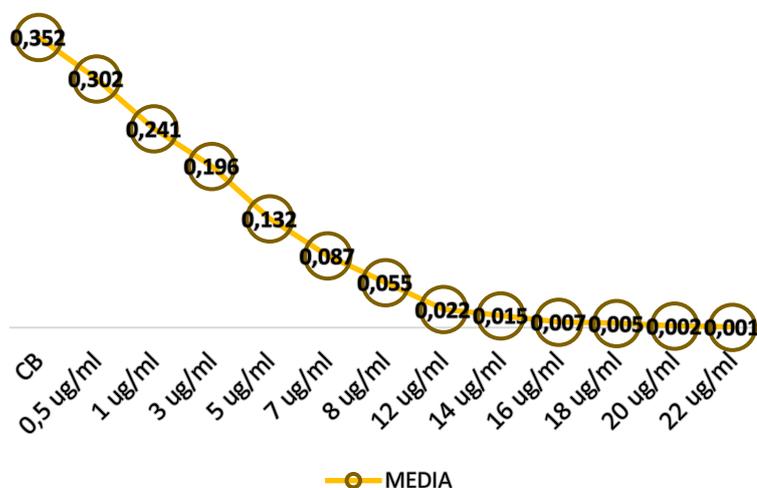


Figura 13. Curva de Inhibición de prueba para CRO

- Una vez realizada la primera prueba con una batería extensa de concentraciones del fármaco se decidió trabajar con: 1µg/ml, 5µg/ml, 14µg/ml, 18µg/ml, 22µg/ml con las 20 cepas de *E. coli* sensibles al fármaco (resultado arrojado de la fase1). Se determinó resultados a través de una media de las 3 réplicas de cada concentración.

En la figura 14 se interrelaciona las cepas con las curvas más significativas dentro del estudio, de forma que la cepa EMG2 se muestra como la menos sensible a la acción del antibiótico mostrando una curva representativa con diferencias entre las concentraciones logrando una inhibición o CMI a 22µg/ml con una absorbancia de 0,002 A. Mientras que, en el caso de la cepa EC12 la cual muestra mayor sensibilidad al fármaco se observó una absorbancia de 0,001 A a los 22µg/ml describiendo así la CMI, sin embargo, se observa que a dosis de 18 µg/ml se estableció una media de absorbancia de 0,007 A del total de cepas, que se considera una óptima inhibición de la bacteria por parte de la CRO.

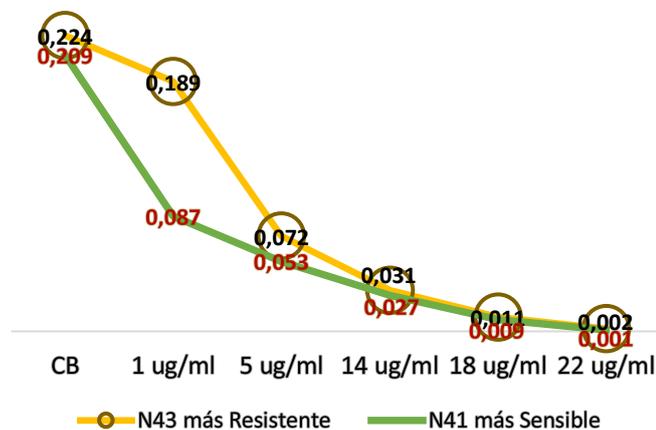


Figura 14. Curva de Inhibición más y menos sensible a CRO

3.2.5 CMI de Amoxicilina + ácido clavulánico (AMC)

Según CLSI (2023) la CMI de AMC es 8/4 µg/ml.

- Concentraciones probadas: 3µg/ml, 6µg/ml, 8µg/ml, 10µg/ml, 13µg/ml, 16µg/ml, 19 µg/ml, 22µg/ml, 25µg/ml, 28µg/ml, 30µg/ml, 33µg/ml (Figura 15).

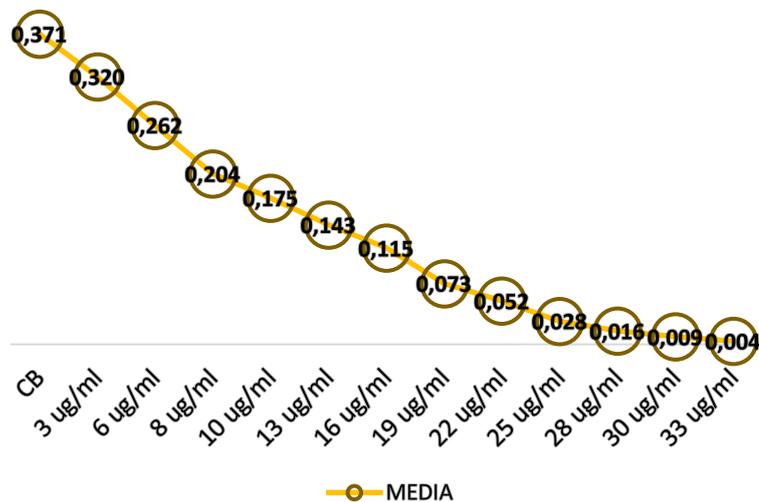


Figura 15. Curva de Inhibición de prueba para AMC

- Una vez realizada la primera prueba con una batería extensa de concentraciones del fármaco se decidió trabajar con: 6µg/ml, 10µg/ml, 22µg/ml, 28µg/ml, 33µg/ml con las 15 cepas de *E.coli* sensibles al fármaco (resultado arrojado de la fase1). Se determinó resultados a través de una media de las 3 réplicas de cada concentración.

En la figura 16 se describe a la curva de inhibición de la cepa 04P3R1D1E1 que se considera la más significativa en cuando a menor sensibilidad mostrada hacia el

fármaco, de forma que la CMI se logra a la dosis más alta del estudio en 33 $\mu\text{g/ml}$ con una absorbancia de 0,007 A. También se describe la curva de la cepa EC12 que fue la más sensible de todas al antibiótico con una absorbancia de 0,001 A, siendo la CMI a la dosis más alta del estudio, sin embargo, a la dosis de 28 $\mu\text{g/ml}$ con una absorbancia de 0,009 A que se considera inhibición considerable.

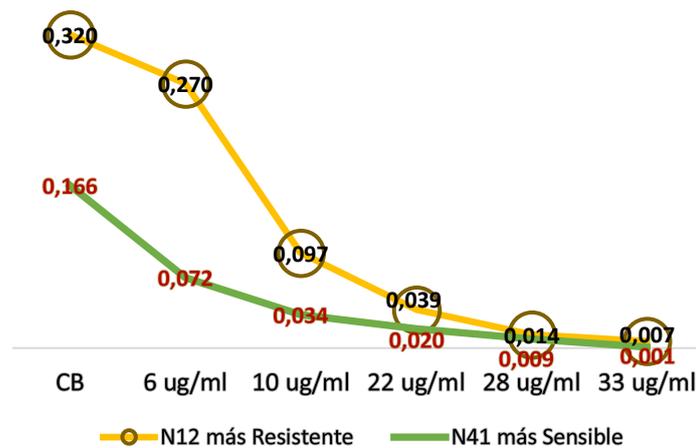


Figura 16. Curva de Inhibición más y menos sensible a AMC

Amoxicilina + ácido clavulánico y Ceftriaxona presenta un espectro de acción contra gram positivas y gram negativas, pero Ceftriaxona tiene un espectro más amplio en comparación con amoxicilina que solo actúa sobre algunos gram negativos donde destaca *E.coli*, además, Amoxicilina se encuentra en unión con ácido clavulánico que es un inhibidor de betalactamasas que es el principal mecanismo de resistencia de *E.coli* a la acción de los Betalactámicos (Calvo & Martínez, 2019).

Los betalactámicos tienen la capacidad de eliminar a *Escherichia coli* al inhibir la formación de la pared celular bacteriana que en *E.coli* es delgada y se encuentra protegida por una membrana a base de lípidos y proteínas, de forma que los betalactámicos van a actuar uniéndose a las PBP (proteínas fijadoras de penicilina) con capacidad de estimular a las transpeptidasas, transglucosilasa y carboxipeptidasa, además provocan la formación de un complejo irreversible entre los peptidoglucanos de forma que no permiten su acción en la formación de la pared bacteriana dejando

desprotegida a la bacteria y desencadenando su lisis por alteraciones en la presión oncótica (Lopardo, 2019).

Los betalactámicos pueden bloquear el crecimiento de *E.coli* inhibiendo a diferentes PBP, por lo que se puede encontrar niveles de eficacia que difieren significativamente entre fármacos de la misma familia, al bloquear los PBP1 se altera la morfología de la bacteria provocando su lisis, los PBP2 hacen a las bacterias ovoides que se destruyen fácilmente, las PBP3 al inhibirse no logran actuar en la división celular, de forma que no se produce y las bacterias son destruidas por la acción de los betalactámicos, estos fármacos también actúan a través de autolisinas que provocan la destrucción de los peptidoglicanos provocando un desequilibrio general en la hidrólisis y por ende la muerte de la bacteria (Lopardo, 2019).

Gonzales (2022) en su estudio determinó las dosis efectivas para inhibir el crecimiento de *Escherichia coli*, de diferentes fármacos entre ellos Ceftriaxona y Amoxicilina + ácido clavulánico. En el caso de la Ceftriaxona se determinó que en las cepas con las que se trabajó se necesitaba dosis altas del fármaco para llegar a la CMI, se logra la inhibición en una media de 12- 18 $\mu\text{g/ml}$ mientras que Amoxicilina + ácido clavulánico logró inhibir el crecimiento de *E.coli* en dosis de 22-30 18 $\mu\text{g/ml}$. Estos parámetros se consideran relativamente similares a los determinados en la presente investigación donde CRO mostró una CMI en 18-22 $\mu\text{g/ml}$ y AMC en 28-33 $\mu\text{g/ml}$, concordando también con los datos establecidos por (Rodríguez et al., 2019)

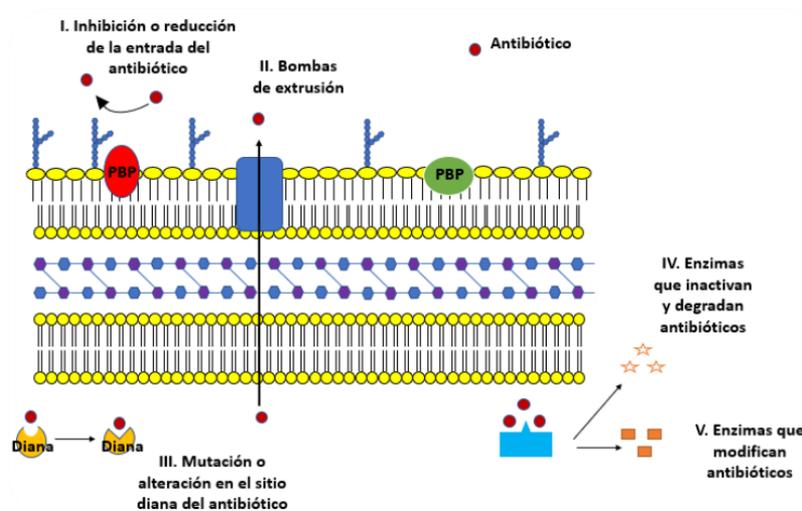
En su investigación Rodríguez et al. (2019), determinó que el 94% de las cepas de *Escherichia coli* estudiados se inhibían en dosis 8 veces superiores a las descritas por la CLSI (2019) en los betalactámicos, esto se relaciona con una mayor actividad que ha incrementado de forma exponencial de las betalactamasas haciendo cada vez más resistentes a las bacterias. En el caso de la presente investigación se siguieron los puntos de corte de la CLSI (2023) donde AMC= 8/4 $\mu\text{g/ml}$ y CRO= 1 $\mu\text{g/ml}$, pero de igual forma que en las investigaciones de Rodríguez (2019) y (Gonzales, 2022) se necesitaron dosis mucho más altas a las establecidas para llegar a la CMI y de igual

forma se coincide con Rodríguez (2019) que remite esta resistencia a la mayor acción de las betalactamasas, y dado que los betalactámicos suelen ser los antibióticos de elección en la mayoría de las infecciones principalmente de forma empírica es normal que los mecanismo de resistencia hayan mejorado y desarrollado mejores métodos para evadir la acción de los betalactámicos.

3.3. Mecanismos moleculares de resistencia de *Escherichia coli* a AK, CIP, CN, CRO, AMC.

Se describe los mecanismos moleculares de resistencia de las Cepas más resistente a todos los antibióticos, de forma que se establecerá las distintas formas de evasión de la cepa de *Escherichia coli* para inhibir, bloquear o alterar los mecanismo de acción de los antimicrobianos empleados en el trabajo investigativo.

Los principales mecanismos moleculares que *Escherichia coli* ha desarrollado para inhibir la acción de los antibióticos son: Inhibición enzimática, Modificaciones en el sitio de acción y cambios en pared celular, a través de la modificación en la permeabilidad (Figura 16) (Bello, 2023).



(Bello, 2023)

Figura 17. Mecanismo de resistencia bacterianos.

De las 31 cepas de *Escherichia coli* con las que se trabajó en la presente investigación las cepas que mayor resistencia presentaron a los 5 tipos de antibióticos: Amikacina, Ciprofloxacina, Gentamicina, Ceftriaxona y Amoxicilina+ ácido clavulánico, fueron las Cepas 56 y 02P2R1D2E3 destacando principalmente la cepa 56 que estadísticamente mostró una diferencia considerable con el resto de las cepas concluyéndola como la cepa más resistentes del total de aislados bacterianos (Tabla 12).

Tabla 12. Resultados Fase1(Antibiorresistencia) de Cepa 56 y 02P2R1D2E3

| Discos | 56 | Resultado | 02P2R1D2E3 | Resultado |
|--------|----|-----------|------------|-----------|
| AK | 16 | I | 17 | S |
| CIP | 12 | R | 10 | R |
| CN | 19 | S | 20 | S |
| CRO | 19 | R | 14 | R |
| AMC | 13 | R | 8 | R |

Tomando como punto de referencia los puntos de cortes determinados por la CLSI (2023) donde se indican los tamaños de los halos de inhibición en mm, se determinó que la cepa 56 muestra una resistencia marcada a Ciprofloxacina, Ceftriaxona y Amoxicilina+ ácido clavulánico, además de una resistencia intermedia a amikacina, de forma que la única forma en la que actúa este aminoglucósido es empleando las dosis más altas establecidas.

En el caso de la cepa 02P2R1D2E3 se presentó una resistencia marcada a Ciprofloxacina, Ceftriaxona y Amoxicilina + ácido clavulánico de forma que los mecanismo de inhibición no permiten que el mecanismo de acción de los antimicrobianos no se ejerza.

3.3.1 Mecanismos de resistencia de *E.coli* a Betalactámicas.

Los betalactámicos empleados en el presente estudio fueron Amoxicilina + ácido clavulánico perteneciente a la familia de las Aminopenicilinas en combinación con un inhibidor de las betalactamasas, principal mecanismo de resistencia de *E.coli* y Ceftriaxona una cefalosporina de tercera generación.

El principal mecanismo molecular de inhibición de *Escherichia coli* ante los betalactámicos se da por hidrólisis enzimática en los enlaces amidas a nivel del núcleo betalactámico, de forma que el fármaco es incapaz de bloquear el entrecruzamiento de péptidos indispensables para la formación de la pared celular, al no lograr evitar la síntesis de la pared se confiere protección anatomofisiológica para la bacteria (Tamayo- Contreras et al., 2021). Esto ocurre tanto para penicilinas como cefalosporinas, al inhibir el antibiótico se deriva en ácidos sin acción farmacológica. Estas enzimas se denominan betalactamasas y en *E.coli* se codifican a nivel de los cromosomas y plásmidos, existen varias betalactamasas, pero la más común en gram negativas es la TEM-1 (Quiñones et al., 2020).

Tamayo-Contreras et al., (2021) sustenta lo descrito en su investigación determinando que la principal resistencia contra los betalactámicos se debe a la presencia de Betalactamasas. En su estudio se aislaron 162 cepas de *E.coli* de las cuales 52 cepas sintetizaban BLEE (Betalactamasas de espectro extendido) y todas estas cepas resultaron resistentes a los betalactámicos como Ampicilina, Amoxicilina + ácido clavulánico que mostraron una resistencia de 71% mientras que en cefalosporinas de segunda y tercera generación la resistencia fue del 26-33%. Esto difiere de la presente investigación donde amoxicilina + ácido clavulánico presentó una resistencia de 9,8% por debajo de ceftriaxona con 25,8%, se considera que esto se produce por la ausencia de un inhibidor de betalactamasas que en el caso de amoxicilina confiere mayor eficacia en el fármaco.

Los resultados del presente trabajo investigativo, se apoyó con los resultados de la investigación realizada por Quiñonez et al. (2020) donde se determinó una resistencia a betalactámicos del 61,3-89,1% , encontrándose una menor resistencia en aquellos que presentaban inhibidores de betalactamasas como: ampicilina + sulbactam, piperacilina+ tazobactam y amoxicilina + ácido clavulánico. La betalactamasa de mayor hallazgo en el estudio de Quiñonez et al. (2020) BLEE (43,7%) y TEM-1 (45%) concordando con lo descrito en la investigación donde TEM-1 es una de las enzimas más presentes en aislados de *E.coli* que le confieren la habilidad de inhibir en su totalidad la acción de los betalactámicos.

3.3.2 Mecanismos de resistencia de *E.coli* a Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos estudiados en esta investigación fueron: Gentamicina y Amikacina ambos con acción bactericida, indicados para infecciones provocadas por gram negativas. Gentamicina suele ser el fármaco más empleado de esta familia, por su efectividad, sin embargo, Amikacina se emplea en infecciones más graves e incluso cuando existe resistencia a Gentamicina (Lopardo, 2019).

Los aminoglucósidos necesitan unirse al ARNr 16S de la subunidad 30S a nivel de ribosomas para cumplir con su actividad bactericida e interferir con la síntesis proteica, sin embargo, *Escherichia coli* ha desarrollado resistencia a los aminoglucósidos principalmente por la formación de enzimas modificadoras codificadas a nivel de los plásmidos (Monterroso et al., 2019). Estas enzimas provocan mutaciones en los grupos aminos (r N-acetiltransferasas) y en los grupos hidroxilo (O-fosfotransferasas (APH), reduciendo la afinidad del fármaco y su capacidad para unirse a los ribosomas (sitio de acción) (Sánchez, 2021).

E.coli también inhibe la acción de los aminoglucósidos al alterar el transporte del antibiótico al punto diana debido a una sobre expresión de los transportadores provocado por mutaciones en los genes reguladores desencadenando altas

concentraciones del fármaco y la resistencia menos frecuente presente en *E.coli* es una modificación general de los ribosomas de forma que el fármaco no puede reconocer el sitio de acción y por ende no cumple su acción farmacológica (Lopardo, 2019).

Monterroso et al. (2019) en un total de 36 aislados de *Escherichia coli* estableció la resistencia de los aminoglucósidos: Gentamicina, Tobramicina, Amikacina y Kanamicina, estableciendo una resistencia del 17-42%, relativamente baja en comparación con otras familias de antibióticos presentes en el estudio, pero se destaca que el principal mecanismo de resistencia ante *E.coli* fue la presencia de enzimas modificadoras de forma que de los 36 aislados, el 39% (14/36) se identificó N-acetiltransferasas en 10 de los 36 aislados resistentes a aminoglucósidos, O-fosfotransferasas estuvo presente en 4/36, coincidiendo con las enzimas ya descritas en este trabajo investigativo, concluyendo que la efectividad de los antibióticos aminoglucósidos disminuye significativamente por la presencia de AME (enzimas modificadoras de aminoglucósidos), que respaldándonos en el estudio de (Monterroso, et al., 2019) *Escherichia coli* presenta una alta facilidad para su síntesis.

Sánchez (2021) también coincide con lo descrito en la investigación, dado que en su estudio determina que el principal método de evasión de las enterobacterias hacia los aminoglucósidos se basa en la síntesis de EMA, principalmente ACC (N-acetiltransferasas) y ANT (nucleotidiltransferasa), esta última es la más común identificada en la resistencia hacia gentamicina y tobramicina, mientras que Amikacina se ve afectada en mayor proporción por ACC. De total de 44 aislados de *E.coli* el 91% mostró resistencia a aminoglucósidos por presencia de ACC, esto se puede relacionar con los resultados obtenidos en esta investigación donde amikacina mostró una menor eficacia en comparación con gentamicina, dado que la EMA más común que se identifica en *Escherichia coli* es ACC que se caracteriza por evadir la acción de la Amikacina.

Otro método de resistencia que describe Sánchez (2021) son las bombas de expulsión MexXY-OprM que, por mutaciones en los canales, no permiten el ingreso del fármaco

o lo expulsan antes de llegar a su sitio de acción, sustentando lo descrito en el presente trabajo investigativo al describir este método de evasión por parte de *E.coli* a la acción farmacológica de los antibióticos como uno de los mecanismos más comunes que *E.coli* presenta contra los aminoglucósidos.

3.3.3 Mecanismos de resistencia de *E.coli* a fluoroquinolonas.

Ciprofloxacina fue la fluoroquinolona de elección para el presente estudio, presenta un espectro de acción amplio de forma que actúa contra gram positivas, gram negativas, aeróbicas y anaeróbicas, presenta efecto bactericida por lo que es uno de los fármacos de esta familia más empleados en distintas infecciones (Lopardo, 2019).

La forma en la que *Escherichia coli* inhibe la acción de ciprofloxacina que se basa en la formación de un complejo con las topoisomerasas irreversible, enzima encargada del desenrollamiento del ADN bacteriano, de forma que se inhibe a la topoisomerasa bloqueando la transcripción y replicación provocando la lisis de las bacterias. *E.coli* evade el mecanismo de acción a través de mutaciones a nivel cromosómico provocando modificaciones en ADN girasa y topoisomerasa IV, de forma que Ciprofloxacina no es capaz de unirse a las enzimas para formar el complejo y pierde su acción farmacológica (Guamán, 2020).

E.coli presenta la capacidad de sintetizar genes a nivel de plásmidos entre los que destaca *qnr* que protege a las enzimas ADN girasa y Topoisomerasa bloqueando la acción de las quinolonas y fluoroquinolonas. Existe resistencia cruzada con los aminoglucósidos a través de la enzima ACC (N-acetiltransferasas) que provoca la acetilación del nitrógeno en posición 7 de la ciprofloxacina y en menor proporción se describe la resistencia por bombas de expulsión como QepA y OqxAB (Sánchez, 2021).

Sánchez (2021) coincide en que el principal mecanismo de resistencia de *Escherichia coli* ante las fluoroquinolonas se basa en la mutación de las enzimas a nivel de las subunidades girasa, las más comunes son gyrA/gyrB y topoisomerasa IV, principalmente parC/parE, de este grupo de enzimas las que se aíslan con mayor frecuencia siendo las principales causantes de resistencia marcada son gyrA y parC. En su estudio se determinó una resistencia a fluoroquinolonas del 50% y de las 44 cepas aisladas en el estudio se estableció que el 91% presentaba resistencia por ACC, es decir, resistencia cruzada para los aminoglucósidos y en cuanto a la identificación de qnrA, qnrB y qnrS principales protectores de las enzimas para bloquear la acción de ciprofloxacina, se encontró que en el total de cepas (n=44) el resultado fue negativo para los tres genes, determinando una baja prevalencia.

Guamán (2020) en un total de 25 cepas de *Escherichia coli* se obtuvo una resistencia a ciprofloxacina de 47,7% que fue una de las más altas en comparación con otros antibióticos del estudio, esto se puede sustentar con los resultados de la presente investigación donde ciprofloxacina resulto el fármaco menos eficiente contra *E.coli*. También se realizó el análisis para determinar la presencia de genes gyrA, gyrB, parC y parE y se obtuvo que solo 4 cepas resistentes a ciprofloxacina presentaban el gen gyrA, coincidiendo con Sánchez (2021) en que existe una baja prevalencia de estos genes.

Concordando con lo descrito por los autores se determina que el principal mecanismo de resistencia de *E.coli* a ciprofloxacina y otras fluoroquinolonas se basa en las mutaciones a nivel de las enzimas ADN girasa y topoisomerasas en lugar de la producción de genes plasmídicos con la capacidad de proteger a las enzimas. De forma que a través de las mutaciones en las topoisomerasas no se permite que el fármaco actúe logrando el desenrollamiento del paquete de ADN bacteriano para la replicación y transcripción. Guamán (2020) sustenta a Sánchez (2021) y se concuerda con esta investigación en que la resistencia a fluoroquinolonas ha aumentado exponencialmente debido al uso inadecuado de los fármacos, guiado principalmente por el amplio espectro de acción que presenta de forma que se emplea en varios procesos infecciones

sin reconocer agentes causales o en dosis inadecuados provocando así un mayor desarrollo en la resistencia por parte de la bacteria.

3.4. Verificación de Hipótesis

De acuerdo con los resultados obtenidos en la presente investigación se cumple con la hipótesis alternativa porque las cepas de *Escherichia coli* aisladas en carne de pollo en la ciudad de Ambato, Provincia de Tungurahua muestran resistencia a los antibióticos (Amikacina, Gentamicina, Ceftriaxona, Ciprofloxacina y Amoxicilina + ácido clavulánico) empleados en la investigación.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Las cepas de *Escherichia coli* aisladas en carne de pollo en la ciudad de Ambato provincia de Tungurahua, mostraron una resistencia marcada a las fluoroquinolonas, seguida de resistencia a betalactámicos y en menor proporción a los aminoglucósidos, siendo estos los más efectivos para combatir a *E.coli*.
- La concentración mínima inhibitoria (CMI) de los diferentes fármacos empleados en la investigación, se estableció por encima de las dosis propuestas por la CLSI (The Clinical & Laboratory Standards Institute), debido al rápido desarrollo y mejoras de los mecanismo de resistencia de *E.coli*, principalmente por el uso inadecuado de antibióticos a nivel mundial.
- *Escherichia coli* presenta diferentes mecanismos moleculares de resistencia para una misma familia de antibióticos, incluso ha desarrollado mecanismo específicos para determinados antibióticos, logrando evadir en algunos casos de forma sencilla a la farmacodinamia de los antibióticos.

4.2. Recomendaciones

- Se recomienda una investigación sobre los genes de resistencia presentes en las cepas estudiadas ya que se consideran de suma importancia en la capacidad de *E.coli* para establecer la resistencia a los antibióticos.
- Se recomienda emplear antibióticos únicamente cuando sean necesarios, tomando en cuenta mecanismo de acción y espectro de estos. Además, de ser posible acompañado de un antibiograma que determine la sensibilidad de patógeno al antimicrobiano para evitar que la resistencia bacteriana siga creciendo.
- Establecer programas higiénicos sanitarios en el faenamiento de aves, para evitar la contaminación bacteriana con potencial patógeno para las personas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amancha, G., Celis, Y., Irazabal, J., Falconi, M., Villacis, K., Thekkur, P., Nair, D., Perez, F., & Verdonck, K. (2023). High levels of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella* from poultry in Ecuador. *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health*, 47(21), 1–9. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2023.15>
- Bello, S. (2023). Mecanismos de resistencia a antibióticos en bacterias. Tratamientos alternativos. In *Repositorio de la Universidad de Coruña*.
- Bernardez, M. (2019). Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana. *Salud Publica de Mexico*, 36(4), 428–438.
- Britanialab. (2021). *Guía de Medios Britanialab*. Britanialab.Com. <https://www.britanialab.com/home>
- Brito, S. (2019). Resistencia antimicrobiana de cepas comensales de *Escherichia coli* en aislados de carne de pollo. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 36(3), 459. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2019.363.4366>
- Brito, Y. (2019). Evaluación de la resistencia microbiana de *Escherichia coli* y *Escherichia coli* O157:H7 en carne de res faenada en Quito-Ecuador. In *Repositorio de la Universidad Central del Ecuador* (Vol. 1, Issue 1). http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84865607390&partnerID=tZOtx3y1%0Ahttp://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=2LIMMD9FVXkC&oi=fnd&pg=PR5&dq=Principles+of+Digital+Image+Processing+fundamental+techniques&ots=HjrHeuS_
- Bullon, J., & Vasquez, P. (2019). *Revisión sistemática de tesis universitarias peruanas relacionadas a la resistencia antimicrobiana de enterobacterias. Período 2010-2020*.
- Calvo, J., & Martínez, L. (2019). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44–52.

<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>

Carvajal, B., Rueda, G., Talavera, R., Torres, C., López, V., & Vásquez, M. (2021). Resistance to beta-lactam antibiotics and quinolones in *Escherichia coli* isolated from broilers. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 32(2), 1–13. <https://doi.org/10.15381/rivep.v32i2.20012>

Carvajal, E., Hernández, A., Torres, C., López, V., & Rueda, G. (2019). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* strains isolated from the bursa of Fabricius in broilers. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 30(1), 430–437. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i1.14648>

Castro, K., & Schettini, M. (2020). “RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *ESCHERICHIA COLI* AISLADA DE MATERIA FECAL DE AVICULTORES, ASOCIADO AL USO DE ANTIBIÓTICOS EN LA CRIANZA DE POLLOS, CALCETA-BOLÍVAR.” In *Repositorio de la Universidad Estatal de Manabí* (Vol. 4, Issue 1). <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/en/mdl-20203177951%0Ahttp://dx.doi.org/10.1038/s41562-020-0887-9%0Ahttp://dx.doi.org/10.1038/s41562-020-0884-z%0Ahttps://doi.org/10.1080/13669877.2020.1758193%0Ahttp://sersec.org/journals/index.php/IJAST/article>

CEVALLOS, G. (2011). *GAD Municipal Cevallos*. Página Oficial GAD Cevallos. <http://www.cevallos.gob.ec/>

CLSI. (2023). *CLSI VET01S ED6:2023 — Normas de rendimiento para pruebas de susceptibilidad de dilución y disco antimicrobiano para bacterias aisladas de animales, 6.ª edición*. Clsivet.Org. http://clsivet.org/GetDoc.aspx?doc=CLSI_VET01S_ED6:2023&xormat=SPDF&src=BB

Egas, R. (2018). Aislamiento e identificación de *Salmonella* y *Escherichia coli* productor de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en granjas avícolas de reproductoras pesadas en las provincias de Napo y Pastaza, Ecuador. In *Repositorio de la Universidad Central del Ecuador* (Vol. 2, Issue 3). <http://dx.doi.org/10.1186/s13662-017-1121-6%0Ahttps://doi.org/10.1007/s41980-018-0101-2%0Ahttps://doi.org/10.1016/j.cnsns.2018.04.019%0Ahttps://doi.org/10.1016/j>

cam.2017.10.014%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.apm.2011.07.041%0Ahttp://arxiv.org/abs/1502.020

Estrada, E., Garma-Quen, P., Guillen, M., Yanez, N., & Novelo, I. (2022). Actividad antibiótica residual de amikacina y su influencia la CMI ante E.coli. *International Journal of Health Science*, 2(68), 2–7. <https://doi.org/10.22533/at.ed.1592682214113>

Giono-Cerezo, S., Santos-Preciado, J., Morfin-Otero, M., Torres-López, F., & Alcántar-Curiel, M. (2020). Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gaceta Médica de México*, 156(2), 172–180. <https://doi.org/10.24875/gmm.20005624>

Gonzales, G. (2022). Resistencia antimicrobiana de Escherichia coli productoras de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en urocultivos de pacientes oncológicos de Lima - Perú, entre enero y diciembre del 2020. In *Suparyanto dan Rosad (2015 (Vol. 5, Issue 3)*. https://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14138/5702/T030_46661406_T_GLADYS_DENISSE_VICTORIO_GONZALES%281%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Guamán, W. (2020). Evaluación de mecanismos moleculares de resistencia a fluoroquinolonas en cepas de E. coli uropatógenas en población nativa amerindia kichwa del Ecuador. In *Repositorio de la Universidad de Salamanca (Vol. 3)*. <http://hdl.handle.net/10366/145299>

Jang, J., Hur, H., Sadowsky, M., Byappanahalli, M., Yan, T., & Ishii, S. (2019). Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications—a review. *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), 570–581. <https://doi.org/10.1111/jam.13468>

Lopardo, H. (2019). Antibioticos Clasificacion, Estructura, Mecanismos De Accion Y Resitencia. *Revista de Microbiología Veterinaria*, 8(3), 191. [www/Desktop/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf](http://www.Desktop/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf)

López-Velandia, D., Carvajal-Barrera, E., Rueda-Garrido, E., Talavera-Rojas, M., Vásquez, M., & Torres-Caycedo, M. (2021). Genes de resistencia a aislados de

- Escherichia coli en pollos de engorda. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 13(3), 584–595.
- March-Rosselló, G. (2019). Métodos rápidos para la detección de la resistencia bacteriana a antibióticos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(3), 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.12.005>
- Medina, G. (2021). *PERFIL MICROBIOLÓGICO Y SENSIBILIDAD BACTERIANA EN INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO EN PACIENTES HOSPITALIZADOS DEL SERVICIO DE MEDICINA DEL HOSPITAL QUILLABAMBA, 2019-2020* (Vol. 3, Issue 2).
- Mendieta, V., Gallegos, J., & Peña, S. (2021). Frecuencia de (BLEE) (AmpC) y CARBAPENEMASAS en muestras de urocultivo, en cepas de Escherichia Coli de origen comunitario. *Revista Vive*, 4(11), 387–396. <https://doi.org/10.33996/revistavive.v4i11.101>
- Monterroso, M., Salvatierra, G., Sedano, S., & Calle, E. (2019). Phenotypic detection of antimicrobial resistance mechanisms of Escherichia coli isolates from enteric infections in pigs from technified farms. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 30(1), 455–464. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i1.15670>
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J., & Ochoa, S. (2020). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en Escherichia coli. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(4), 648–656. <https://doi.org/10.17843/rpmpesp.2011.284.430>
- Núñez, D., Tomapasca, S., Vergara, M., Ipanaque, K., & Cabrejos, C. (2022). Efecto de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de Ciprofloxacina frente a Escherichia coli aislada de infecciones del tracto urinario. *Angewandte Chemie International*, 3(1), 10–27. <https://medium.com/@arifwicaksanaa/pengertian-use-case-a7e576e1b6bf>
- Quiñones, D., Betancourt, Y., Carmona, Y., Pereda, N., Álvarez, S., Soe, M., & Kobayashi, N. (2020). Escherichia coli extraintestinal, resistencia antimicrobiana y producción de betalactamasas en aislados cubanos. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 72(3), 1–18.

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602020000300006&lang=es

Reyes-Baque, M., Valero, N., Conraquer, S., & Toaponta, A. (2021). Resistencia antimicrobiana en *Escherichia coli* aislada de materia fecal de avicultores, asociado al uso de antibióticos en la crianza de pollos. *Revista Científica de La Facultad de Medicina*, 7(3), 1343–1370.

Rodríguez, Á., Younes, S., Lepe, J., & Pachón, J. (2019). *Bacteriemias por Escherichia coli: análisis clínico-epidemiológico, factores de patogenicidad y mecanismos de resistencias a betalactámicos/inhibidores de bectalactamasas*. [https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/93377/Copia sin artículos Tesis Angel Rodriguez Villodres.pdf?sequence=1&isAllowed=y&fbclid=IwAR1TV7yjPoO-ED6OzMzK-V3CwjW0CuhTiiLwBHIR1BQFIQ2MxIYAFh1XBjA](https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/93377/Copia%20sin%20art%C3%ADculos%20Tesis%20Angel%20Rodr%C3%ADguez%20Villodres.pdf?sequence=1&isAllowed=y&fbclid=IwAR1TV7yjPoO-ED6OzMzK-V3CwjW0CuhTiiLwBHIR1BQFIQ2MxIYAFh1XBjA)

Rojas, R., Burgos, A., Arias, J., Monges, C., Battagli, P., & Santa, F. (2019). Sensitivity profile of *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections of patients of the Regional Hospital of Villarrica from July 2013 to August 2015. *Anales de La Facultad de Ciencias Médicas (Asunción)*, 52(2), 17–22. [https://doi.org/10.18004/anales/2019.052\(02\)17-022](https://doi.org/10.18004/anales/2019.052(02)17-022)

Sánchez, M. (2021). *Determinación de genes de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas y bombas de expulsión en Enterobacterias*.

Tamayo- Contreras, D., Gonzales, A., Sarmiento, W., & Pérez, S. (2021). Efecto de los betalactámicos sobre *Escherichia coli* y sus mecanismo de resistencia, producción de betalactamasas. *Rev. Cuerpo Med. HNAAA*, 15(1), 42–45. <https://doi.org/10.35434/rcmhnaaa>

TMMEDIA. (2022). *Agares-Indicaciones*. Tmmedia.In. <https://www.tmmedia.in/>

Vaz, P. (2022). Concentração Preventiva de Mutantes de ciprofloxacina em *Providencia sp . e E . coli* transformantes carreadoras do gene *qnrD*. *Instituto Microbiológico Paulo de Goes*, 4(3), 1–56.

Velasquez, M. (2023). “*DETERMINACIÓN DE PERFILES DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA DE LA Escherichia coli REPORTADA EN MUESTRAS DE POLLOS DE ENGORDE RECEPCIONADOS EN LABVETSUR EN EL*

PERIODO 2010 - 2019.”

- Villacís-Jara, K., Irazabal, J., & Granda, E. (2019). *Determination of antibiotic sensitivity profiles in Escherichia coli and Salmonella spp. isolated from chicken meat in Ecuador* (Vol. 4, Issue 2). [http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/18532/Tesis formato artículo - Karla Villacís 13-08-20 %281%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/18532/Tesis_formato_articulo_-_Karla_Villacis_13-08-20_28129.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Vinueza-Burgos, C., Ortega-Paredes, D., Narvaéz, C., De Zutter, L., & Zurita, J. (2019). Characterization of cefotaxime resistant *Escherichia coli* isolated from broiler farms in Ecuador. *PLoS ONE*, *14*(4), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207567>
- Yang, X., Wang, D., Zhou, Q., Nie, F., Du, H., Pang, X., Fan, Y., Bai, T., & Xu, Y. (2019). Antimicrobial susceptibility testing of Enterobacteriaceae: Determination of disk content and Kirby-Bauer breakpoint for ceftazidime/avibactam. *BMC Microbiology*, *19*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1613-5>

ANEXOS

Anexo 1. Tabulación resultados Fase 1 (Antibiorresistencia)

| A | B | C | D | E | F | G |
|--------------------------|-------|-------------|-------|------|---------|-----------|
| MEDICIÓN HALOS #1 | | | | | | |
| CEPA | DISCO | ORIGINAL mm | R1 mm | R2mm | MEDIAmm | RESULTADO |
| N34 | AK | 17 | 17 | 18 | 17 | S |
| | CIP | 8 | 8 | 8 | 8 | R |
| | CN | 15 | 15 | 14 | 15 | S |
| | CRO | 9 | 9 | 9 | 9 | R |
| | AMC | 18 | 17 | 18 | 18 | S |
| | | | | | | |
| N35 | AK | 25 | 24 | 27 | 25 | S |
| | CIP | 24 | 26 | 27 | 26 | S |
| | CN | 30 | 32 | 31 | 31 | S |
| | CRO | 13 | 13 | 14 | 13 | R |
| | AMC | 25 | 25 | 26 | 25 | S |
| | | | | | | |
| N36 | AK | 18 | 14 | 17 | 16 | I |
| | CIP | 9 | 8 | 8 | 8 | R |
| | CN | 21 | 18 | 22 | 20 | S |
| | CRO | 34 | 31 | 30 | 32 | S |
| | AMC | 22 | 20 | 23 | 22 | S |
| | | | | | | |
| N12 | AK | 17 | 18 | 16 | 17 | S |
| | CIP | 21 | 22 | 22 | 22 | S |
| | CN | 20 | 21 | 20 | 20 | S |

Anexo 2. Cálculo estadístico, tabla de Excel Fase 1 (Antibiorresistencia)

| | A | B | C | D | E | F | G | H |
|----|------|---|-------------|----------|--------------|-----------------------|--------------|---|
| 1 | Cepa | | Antibiótico | Réplicas | Sensibilidad | | | |
| 2 | N34 | 1 | 1 | 1 | 3 | | | |
| 3 | | 1 | 1 | 2 | 3 | | | |
| 4 | | 1 | 1 | 3 | 3 | | | |
| 5 | | 1 | 2 | 1 | 1 | | Sensibilidad | |
| 6 | | 1 | 2 | 2 | 1 | | Resistente | 1 |
| 7 | | 1 | 2 | 3 | 1 | | Intermedio | 2 |
| 8 | | 1 | 3 | 1 | 2 | | Sensible | 3 |
| 9 | | 1 | 3 | 2 | 2 | | | |
| 10 | | 1 | 3 | 3 | 2 | | Antibióticos | |
| 11 | | 1 | 4 | 1 | 1 | | AK | 1 |
| 12 | | 1 | 4 | 2 | 1 | | CIP | 2 |
| 13 | | 1 | 4 | 3 | 1 | | CN | 3 |
| 14 | | 1 | 5 | 1 | 3 | | CRO | 4 |
| 15 | | 1 | 5 | 2 | 3 | | | |
| 16 | | 1 | 5 | 3 | 3 | | AMC | 5 |
| 17 | | | Promedio 1 | | | =SUBTOTALES(1;E3:E16) | | |

Anexo 3. Fotografías de actividades realizadas durante la investigación (Fase 1)



Refreshamiento de cepas de E.coli



Estricción en Agar Tripticasa de Soya (TS)



Ubicación de discos de antibióticos



Lectura de Halos de inhibición

Anexo 4. Tabulación de Resultados Fase 2 (CMI)

| | | AMIKACINA | | | | |
|--------------|-----|-----------------------|----------|-------|-------|--------------|
| CEPAS | | | | | | |
| N34 | N2 | N34 CB=> 0.295 | Original | R1 | R2 | MEDIA |
| N35 | N3 | 12 ug | 0,190 | 0,191 | 0,190 | 0,190 |
| N12 | N29 | 14 ug | 0,157 | 0,156 | 0,156 | 0,156 |
| N37 | N34 | 16ug | 0,118 | 0,117 | 0,117 | 0,117 |
| N41 | N45 | 18ug | 0,060 | 0,061 | 0,060 | 0,060 |
| N45 | N40 | 20ug | 0,012 | 0,009 | 0,009 | 0,010 |
| N43 | N17 | N35 CB=> 0.187 | Original | R1 | R2 | |
| N38 | N32 | 12 ug | 0,166 | 0,166 | 0,166 | 0,166 |
| N4 | N41 | 14 ug | 0,120 | 0,121 | 0,121 | 0,121 |
| N8 | N39 | 16ug | 0,088 | 0,088 | 0,087 | 0,088 |
| N10 | N30 | 18ug | 0,032 | 0,032 | 0,032 | 0,032 |
| N26 | | 20ug | 0,009 | 0,009 | 0,009 | 0,009 |
| | | N12 CB=> 0.242 | Original | R1 | R2 | |
| | | 12 ug | 0,160 | 0,160 | 0,160 | 0,160 |
| | | 14 ug | 0,112 | 0,111 | 0,112 | 0,112 |
| | | 16ug | 0,065 | 0,065 | 0,066 | 0,065 |
| | | 18ug | 0,012 | 0,012 | 0,012 | 0,012 |
| | | 20ug | 0,006 | 0,005 | 0,005 | 0,005 |

Anexo 5. Determinación cepas más y menos sensibles a los antibióticos (CN)

| | | GENTAMICINA | | | | |
|-------------------|--|-----------------------|----------|-------|-------|--------------|
| RESISTENTE | | N38 CB=> 0.343 | Original | R1 | R2 | MEDIA |
| | | 14 ug | 0,130 | 0,131 | 0,131 | 0,131 |
| | | 16 ug | 0,053 | 0,053 | 0,054 | 0,053 |
| | | 18 ug | 0,023 | 0,022 | 0,022 | 0,022 |
| | | 20 ug | 0,014 | 0,013 | 0,014 | 0,014 |
| | | 22 ug | 0,003 | 0,002 | 0,002 | 0,002 |
| SENSIBLE | | N39 CB=> 0.198 | Original | R1 | R2 | MEDIA |
| | | 14 ug | 0,064 | 0,064 | 0,063 | 0,064 |
| | | 16 ug | 0,043 | 0,042 | 0,042 | 0,042 |
| | | 18 ug | 0,021 | 0,020 | 0,020 | 0,020 |
| | | 20 ug | 0,006 | 0,006 | 0,006 | 0,006 |
| | | 22 ug | 0,000 | 0,000 | 0,001 | 0,000 |

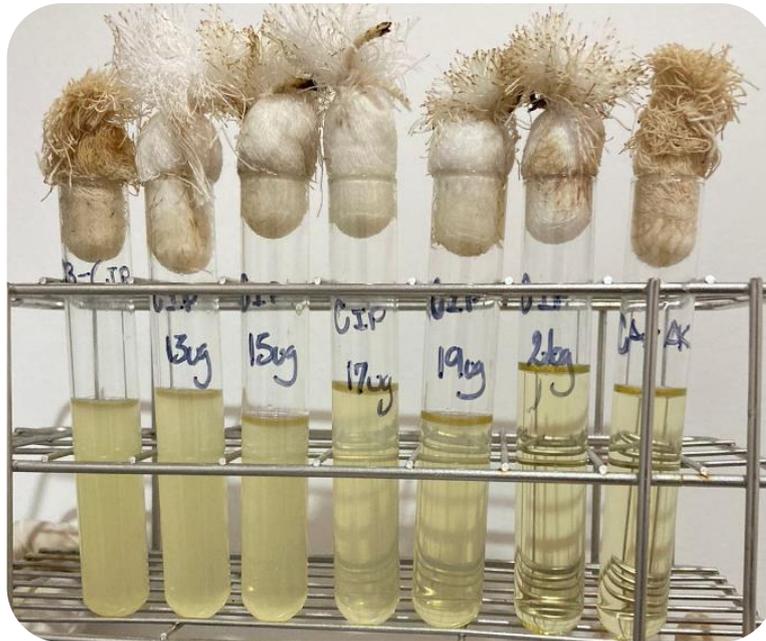
Anexo 6. Fotografías de actividades realizadas durante la investigación (Fase 2)



Colocación de bacteria en Luria Bertani



Colocación de antibiótico en Luria Bertani



Crecimiento bacteriano post 24 h de incubación (CIP)



Crecimiento bacteriano post 24h de incubación (CN)



Colocación de cubetas en espectrofotómetro para medir absorbancia



Lectura de curvas de inhibición