



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN
ALIMENTOS
Y BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA



Caracterización de los perfiles de resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* aislada de mamíferos en cautiverio del EcoZoológico San Martín – Baños de Agua Santa

Informe Final de Integración Curricular, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

AUTOR: Anabell Yessenia Medina Pujos

TUTOR: PhD. William Ricardo Calero Cáceres

Ambato – Ecuador

Septiembre 2022

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. William Ricardo Calero Cáceres

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final de Integración Curricular ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autoriza la presentación de este Informe Final de Integración Curricular bajo la Modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de la Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 24 de agosto del 2022

PhD. William Ricardo Calero Cáceres

C.I. 1714344885-9

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Anabell Yessenia Medina Pujos, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Anabell Yessenia Medina Pujos

C.I. 180445090-4

AUTOR

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores calificadores, aprueban el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Presidente del Tribunal

PhD. Lorena de los Ángeles Núñez Villacís

C.I. 180425690-5

MSc. María Daniela Garcés Moncayo

C.I. 180357158-5

Ambato, 1 de septiembre de 2022

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que considere el presente Informe Final de Integración Curricular o parte de él un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final de Integración Curricular, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Anabell Yessenia Medina Pujos

C.I. 180445090-4

AUTOR

DEDICATORIA

A mis padres y hermano

quienes me ha apoyado

incondicionalmente.

Gracias por ayudarme

a alcanzar mis sueños y metas.

Dios los bendiga.

Anabell Medina

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios y a mis padres quienes me han permitido terminar con éxito este trabajo.

Además, me gustaría expresar mis agradecimientos a las siguientes personas, quienes me ayudaron con el presente proyecto de investigación:

Mi supervisor Dr. William Calero, por su confianza, apoyo y paciencia durante la realización de esta investigación.

Sr. Orlando Vega, propietario del EcoZoológico San Martín, gracias por permitirme realizar mi tesis en tan noble centro de conservación y educación.

Dra. Yadira Vega, por su constante ayuda y su tiempo en la recolección de información de las especies estudiadas.

A los trabajadores y pasantes del EcoZoológico San Martín, quienes se tomaron el tiempo de ayudarme con la recolección de muestras y sin quienes no hubiese logrado muestrear todos los hábitats del zoológico.

Mis amigos: Gaby, Duda, Migue, Jenny, Melanie y Daniel; gracias por ser como son, por las risas, los consejos, su apoyo y tiempo.

Para terminar, no puedo olvidar a los nuevos tesistas del Dr. Calero: Jenny, Pato, Rosita, Joyce, Christian y Liss; su presencia en el laboratorio fue de mucha ayuda durante la etapa experimental de mi tesis. Gracias, chicos.

ÍNDICE

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO 1	1
MARCO TEÓRICO	1
1.1. Antecedentes investigativos	1
1.1.1. Emergencia de la resistencia a los antimicrobianos (RAM)	1
1.1.2. Surgimiento y diseminación de bacterias multirresistentes	3
1.1.2.1. <i>E. coli</i> y sus mecanismos de resistencia.....	4
1.1.3. Aparición de RAM en la vida silvestre en cautiverio	5
1.1.3.1. Mamíferos en cautiverio como reservorios de RAM.....	6
1.1.4. Antibióticos de importancia en medicina humana y veterinaria.....	6
1.2. Objetivos	9
1.2.1. Objetivo General	9
1.2.2. Objetivos Específicos.....	9
CAPÍTULO 2	10
METODOLOGÍA	10
2.1. Materiales	14
2.2. Métodos	17
2.2.1. Muestreo y transporte.....	17
2.2.2. Aislamiento	18
2.2.3. Purificación	19
2.2.4. Criopreservación	20
2.2.5. Identificación microscópica (Tinción Gram)	21
2.2.6. Identificación bioquímica.....	22
2.2.7. Pruebas de susceptibilidad	23
2.2.8. Interpretación de los perfiles fenotípicos	24
2.2.9. Fingerprinting (GTG)-5	24

CAPÍTULO 3.....	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
3. 1. Análisis y discusión de los resultados	26
3.1.1. Aislamiento de <i>E. coli</i> y dieta	26
3.1.2. Pruebas de susceptibilidad	29
3.1.3. Fingerprint rep-PCR (GTG5).....	36
3. 2. Verificación de la hipótesis	44
CAPÍTULO 4.....	45
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	45
4. 1. Conclusiones	45
4. 2. Recomendaciones	46
MATERIALES DE REFERENCIA.....	48
Referencias Bibliográficas	48
Anexos	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mamíferos en cautiverio del EcoZoológico “San Martín”	11
Tabla 2. Equipos de laboratorio	14
Tabla 3. Materiales de laboratorio.....	14
Tabla 4. Reactivos de laboratorio.....	15
Tabla 5. Insumos y materiales de escritorio	16
Tabla 6. Pruebas bioquímicas para la caracterización de <i>E. coli</i>	22
Tabla 7. Porcentaje de aislamiento en base a los hábitos alimenticios de los mamíferos del zoológico	29
Tabla 8. Resistencia antimicrobiana de los aislados de <i>E. coli</i>	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Dianas de los principales agentes antibacterianos	7
Figura 2. Estructuras de los principales grupos de antibióticos β -lactámicos	8
Figura 3. Protocolo de recolección y transporte de muestras	17
Figura 4. Protocolo de aislamiento de <i>E. coli</i>	18
Figura 5. Protocolo de purificación de <i>E. coli</i>	19
Figura 6. Protocolo de aislamiento de <i>E. coli</i>	20
Figura 7. Protocolo de identificación microscópica mediante Tinción Gram	21
Figura 8. Pruebas bioquímicas para la identificación de <i>E. coli</i>	23
Figura 9. Protocolo para pruebas de susceptibilidad a antibióticos	24
Figura 10. Frecuencia de aislamiento de <i>E. coli</i> aislada en medio EMB y EMB-CRO	26
Figura 11. Frecuencia de la influencia del tipo de alimentación en los aislados de <i>E. coli</i> en medio EMB-CRO	28
Figura 12. Perfil de resistencia fenotípica de <i>E. coli</i> aislada de muestras fecales de diferentes mamíferos	32
Figura 13. Dendrograma obtenido por análisis de conglomerados de fingerprint rep-PCR (GTG5)	37

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Dieta de los mamíferos del EcoZoológico “San Martín”	57
Anexo 2. Aislados de <i>E. coli</i> fecal criopreservados	62
Anexo 3. Resultados pruebas de identificación de <i>E. coli</i>	66
Anexo 4. Pruebas de identificación de <i>E. coli</i>	71
Anexo 5. Interpretación de los halos de inhibición	72
Anexo 6. Aislados BLEE positivos	73
Anexo 7. Dendrograma obtenido por análisis de conglomerados de fingerprint rep-PCR (GTG5)	74

RESUMEN

La resistencia antimicrobiana (RAM) se ha convertido en un problema de salud pública alrededor del mundo, para el cual deben tomarse acciones que eviten el surgimiento y diseminación de bacterias patogénicas adoptando una perspectiva *One Health*. Alrededor del mundo, uno de los factores del surgimiento de patógenos resistentes ha sido el intercambio zoonótico entre animales y el hombre, y su asociación al empleo de diferentes antimicrobianos en la medicina humana y veterinaria. Por tal motivo, el estudio de especies silvestres o en cautiverio es esencial. Este estudio se centra en caracterizar perfiles de resistencia antimicrobiana en aislados de *E. coli* en mamíferos en cautiverio del EcoZoológico San Martín de Baños de Agua Santa. De un total de 27 muestras fecales recolectadas, 90 cepas fueron aisladas. 32 cepas presentaron resistencia a más de tres familias de antibióticos; no obstante, solo las cepas E57 y E75 aislada de ocelotes (*Leopardus pardalis*) mostraron resistencia a seis familias de antibióticos. Los antibióticos con un mayor porcentaje de resistencia fueron ampicilina (97.5), ceftriaxona (95), cefuroxima (95), trimetoprima/sulfametoxazol (52.5), ceftazidima (47.5) y ciprofloxacina (37.5). Los perfiles generados mostraron la relación de la resistencia a antimicrobianos y la dieta de los mamíferos estudiados, observándose que aquellos aislados de mamíferos con una dieta a base de carne eran *E. coli* multirresistente; además, el tratamiento con antibióticos recibido ayudaba con la presencia de mayor aislados resistentes. Los resultados obtenidos indican que las especies en cautiverio pueden ser potenciales reservorios de bacterias multirresistentes a antibióticos.

Palabras claves: RAM, *E. coli*, EcoZoológico San Martín, salud pública, mamíferos en cautiverio, ocelotes.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance (AMR) has become a public health problem around the world; therefore, to prevent the emergence and spread of pathogenic bacteria, measures should be taken by adopting a *One Health* perspective. Around the world, one of the factors for the emergence of resistant pathogens has been the zoonotic exchange between animals and humans, and its association with the use of different antimicrobials in human and veterinary medicine. For this reason, the study of wild or captive species is essential. This research focuses on characterizing antimicrobial resistance profiles in *E. coli* isolates from captive mammals at the San Martín Eco Zoo in Baños de Agua Santa. From a total of 27 faecal samples collected, 90 strains were isolated. 32 strains presented resistance to more than three families of antibiotics; however, only strains E57 and E75 isolated from ocelots (*Leopardus pardalis*) showed resistance to six families of antibiotics. The antibiotics with the highest percentage of resistance were ampicillin (97.5), ceftriaxone (95), cefuroxime (95), trimethoprim/sulfamethoxazole (52.5), ceftazidime (47.5) and ciprofloxacin (37.5). The generated profiles showed the relationship between resistance to antimicrobials and the diet of the mammals studied, observing that those isolated from mammals with a meat-based diet were multi-resistant *E. coli*; In addition, the antibiotic treatment received helped with the presence of more resistant isolates. The results obtained indicate that captive species can be potential reservoirs of multi-resistant bacteria to antibiotics.

Keywords: RAM, *E. coli*, San Martín Eco Zoo, public health, captive mammals, ocelots.

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

1.1.1. Emergencia de la resistencia a los antimicrobianos (RAM)

En los últimos años, la resistencia a los antimicrobianos (RAM) ha sido considerada “la pandemia silenciosa del siglo XXI”, dado que se ha convertido en una de las mayores amenazas a la salud pública alrededor del mundo. En el año 2018, las estimaciones indicaban que a nivel global 10 millones de muertes por año serían causadas por RAM generando una pérdida de \$100 billones si no se tomaban las medidas adecuadas para abordar esta crisis hasta el año 2050 (Naylor et al., 2018; Oliva-Martínez & Baéz-Gómez, 2019). Para el año 2019, en base a datos recolectados globalmente, se estimó que 4.95 millones de muertes fueron causadas por enfermedades asociadas a RAM bacteriana mostrando así que el escenario anunciado se estaba cumpliendo; por lo cual, era necesario tomar medidas de control y prevención (C. J. Murray et al., 2022).

Dentro de este contexto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) junto con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y el Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) comenzaron a trabajar en conjunto para la erradicación de este fenómeno a través de un enfoque *One Health*, mediante el cual se aborde el problema a nivel local, regional, nacional y mundial, con el objetivo de lograr resultados de salud óptimos considerando la interconexión entre personas, animales, plantas y su entorno compartido (CDC, 2022; IACG, 2019; WHO et al., 2022).

Para conocer la importancia de RAM, su control y erradicación es necesario entender que la resistencia a antimicrobianos es una capacidad adquirida por los microorganismos para resistir los efectos de un agente antimicrobiano al cual normalmente suelen ser sensibles. Es necesario mencionar que los agentes microbianos no son capaces de inhibir completamente a todos los microorganismos; por lo cual, la resistencia antimicrobiana viene a ser una propiedad innata de todos estos (**Madigan et al., 2015**). En este contexto, desde el descubrimiento y uso del primer antibiótico hasta la actualidad se ha observado que el desarrollo de nuevos antimicrobianos ha dado paso a la aparición de nuevas cepas resistentes.

En 1940, incluso antes del uso de la penicilina para el control de infecciones bacterianas ya se reportaba la presencia de una cepa de *Staphylococcus* resistente a este antibiótico; por ello, para 1959 se da paso al empleo de meticilina en el tratamiento de infecciones por bacterias productoras de penicilinasas; sin embargo, un año después se reportaba la presencia de cepas de *Staphylococcus* resistente (**Sengupta et al., 2013**). De la misma forma, en 1989 tras el empleo de la vancomicina para tratar bacterias meticilina-resistentes se reportó la presencia de *Enterococcus* resistentes, mientras que para 1997 se describe *Staphylococcus aureus* resistente. En el caso de la tetraciclina en 1959 se reporta cepas de *Shigella* resistentes y del mismo modo, para 1996 se reporta *Pneumococcus* resistente a levofloxacina (**Christaki et al., 2020**).

La aparición de estas cepas resistentes surge ante la presencia prolongada de los antimicrobianos, la cual acelera el proceso de adaptación de las bacterias u hongos, desarrollando así rasgos de resistencia en su ADN que pueden propagarse a otros microorganismos (**CDC, 2021**). Esta exposición prolongada es uno de los tres principales factores asociados a la crisis por RAM, a esta se une la interconexión entre las diferentes poblaciones que permite el acceso de los patógenos a cualquier entorno y el uso innecesario de agentes antimicrobianos que actúa como detonante de la respuesta evolutiva en el mundo microbiano. De estos factores, la velocidad a la que evolucionan la RAM y los factores de virulencia en el mundo microbiano ofrecen un

medio para gestionar la crisis, dado que pueden reducirse al reducir la presión selectiva aplicada (Michael et al., 2014).

1.1.2. Surgimiento y diseminación de bacterias multirresistentes

Entre los datos presentados en el 2019, se visualiza que 3.57 millones de muertes de las 4.95 millones estimadas fueron causadas por *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* (C. J. Murray et al., 2022). Estos microorganismos son considerados organismos “ESKAPE” debido a que son capaces de “escapar” de los efectos de la mayoría de agentes terapéuticos disponibles; y por ende, son considerados resistentes cuando han logrado ser no susceptibles a 3 o más clases de antimicrobianos; además, a esta cualidad se junta la facilidad con la cual circulan, ya que transitan entre las poblaciones humanas y animales, a través de los alimentos, el agua y el medio ambiente (Abreu et al., 2022; Mills & Marchaim, 2021).

Las bacterias Gram negativas son microorganismos de gran importancia clínica debido a la alta resistencia a los antibióticos que presentan. Dentro de este grupo, las enterobacterias y las bacterias no fermentadoras son responsables de la mayoría de los aislamientos clínicos junto con *Neisseria*, *Haemophilus spp.*, *Helicobacter pylori* y *Chlamydia trachomatis*, bacterias igual de preocupantes a nivel global (Oliveira & Reygaert, 2021). Sin embargo, dentro de todos los microorganismos Gram negativos multirresistentes *E. coli*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia* y *Proteus* se han convertido en un problema preocupante si se considera su capacidad para causar infecciones graves y mortales tras volverse resistentes a una gran cantidad de antibióticos, incluidos los carbapenémicos y las cefalosporinas de tercera generación, considerados los mejores antibióticos disponibles para tratar bacterias multirresistentes (WHO, 2017b).

1.1.2.1. *E. coli* y sus mecanismos de resistencia

Entre las bacterias multirresistentes, el patógeno bacteriano Gram negativo más común es *E. coli*, al cual se le atribuye una amplia frecuencia de enfermedades infecciosas clínicas que afectan a humanos y animales. Esta bacteria normalmente se encuentra habitando el tracto intestinal inferior de los humanos y de otros animales de sangre caliente; esta puede llegar al medio ambiente a través de las heces y las plantas de tratamiento de aguas residuales (**Berthe et al., 2013**). La multirresistencia en *E. coli* se ha convertido en un problema preocupante que se encuentra asociado a la capacidad de esta para acumular genes de resistencia que codifican para β -lactamasas de espectro extendido, carbapenemasas, metilasas 16S rRNA, genes de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos y genes de resistencia móvil a colistina *mcr* (**Poirel et al., 2018**). En el Ecuador, se ha reportado que *E. coli* es el principal microorganismo sujeto a vigilancia por RAM debido a que esta bacteria expresa genes: carbapenemasas de tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemasa*) y NDM (*New Delhi metallo-beta-lactamasa*) (**Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2019**).

Entre los mecanismos de resistencia antimicrobiana que exhibe este patógeno resaltan aquellos en los cuales ocurre una modificación en la molécula del antibiótico, en el caso de los antibióticos β -lactámicos, la modificación causa la destrucción de los componentes mediante la acción de las β -lactamasas. Se han identificado alrededor de 470 β -lactamasas agrupadas en cuatro clases funcionales (clases A, B, C y D), las cuales operan por distintos mecanismos catalíticos (**Munita & Arias, 2016; Wax et al., 2007**). Estas son enzimas que inactivan el anillo β -lactámico mediante la rotura del enlace amida del anillo y la adición de una molécula de agua a la molécula con el anillo abierto, no obstante, cuando estas son de espectro extendido (BLEE) pueden ser capaces de hidrolizar una amplia gama de β -lactámicos causando resistencia a penicilinas, cefalosporinas e incluso, a monobactámicos (**Bergšpica et al., 2020; Bush & Bradford, 2020; MacGowan & Macnaughton, 2017**).

Estas enzimas se subdividen en diez familias según sus secuencias de aminoácidos: CTX-M, TEM, SHV, SFO, PER, VEB, GES, TLA, BES y OXA; no obstante, CTX-M, SHV y TEM son las más prevalentes a nivel mundial (**Bergšpica et al., 2020; Dantas-Palmeira & Neto-Ferreira, 2020**). Por otro lado, las carbapenemasas son un tipo de β -lactamasa capaz de hidrolizar antibióticos carbapenémicos, estas se dividen en clases A, B y D. Las carbapenemasas de clase A y clase D son serina β -lactamasas, y las carbapenemasas de clase B son metalo- β -lactamasas (MBL), cada una asociada a los genes KPC, NDM, VIM, IMP, OXA-48 y OXA-23 (**Cui et al., 2019**).

1.1.3. Aparición de RAM en la vida silvestre en cautiverio

Considerando las consecuencias negativas de la proliferación de bacterias con resistencia a antibióticos en el ambiente, muchas investigaciones han adoptado por un enfoque *One Health* en donde se incluyan una evaluación de la resistencia antimicrobiana en muestras ambientales como suelos, agua y animales salvajes; dentro del estudio de los animales salvajes, se han incluido muestras de animales peri domésticos, animales en cautiverio y animales salvajes libres (**Ramey & Ahlstrom, 2020**). Alrededor del mundo, uno de los factores del surgimiento de patógenos multirresistentes ha sido el intercambio zoonótico entre animales y el hombre, y su asociación al empleo de diferentes antimicrobianos en la medicina humana y veterinaria (**Köck et al., 2021**). En el caso del surgimiento de RAM en vida silvestre, la interacción con humanos puede causar que estos sean portadores de bacterias resistentes a antibióticos, incluidas las *Enterobacteriaceae* (**Swift et al., 2019; Tinoco-Torres et al., 2020**).

A pesar de que se han comenzado a detectar bacterias resistentes a los antimicrobianos en la vida silvestre, aún existen pocos datos relacionados a la transmisión de estos patógenos en el medio ambiente, y de su papel en la salud de la vida silvestre (**Fuentes-Castillo et al., 2021**). Es importante considerar que es poco probable que los animales silvestres sean tratados con antibióticos, pero al mismo tiempo, no se debe desestimar la superposición entre hábitats y su papel en la

transmisión de bacterias resistentes entre diferentes nichos, lo cual genera que varias especies silvestres sean utilizadas como bioindicadores para la propagación de bacterias resistentes en el medio ambiente (**Plaza-Rodríguez et al., 2021**).

1.1.3.1. Mamíferos en cautiverio como reservorios de RAM

Como consecuencia de la creciente popularidad de los zoológicos y refugios de vida silvestre se ha dado un acercamiento entre animales silvestres y humanos, permitiendo que estas especies se conviertan en importantes reservorios de resistencia a antimicrobianos; y por ende, en potenciales bioindicadores de contaminación por RAM (**De Witte et al., 2021**). No obstante, no todas las formas de vida salvaje pueden servir para este fin. Es importante escoger especies con características ecológicas favorables que permitan detectar el origen de RAM, en este contexto, los principales bioindicadores que se han identificado en los últimos años son aves rapaces, aves acuáticas y pequeños mamíferos silvestres (**Zanardi et al., 2020**).

Respecto a los mamíferos exóticos, estos resultan ser de gran importancia en la identificación de formas de propagación de RAM en el entorno; si se consideran las diferencias ecológicas y biológicas de las diferentes especies. Los mamíferos en general están expuestos a fuentes antropogénicas de RAM en el medio ambiente, debido al contacto directo que mantienen con estas fuentes; además, por su naturaleza ubicua, el tamaño pequeño del área de distribución y, a menudo, las dietas generalistas los hacen adecuados para detectar variaciones a escala fina no estudiadas previamente en los patrones de distribución de RAM (**Furness et al., 2017**).

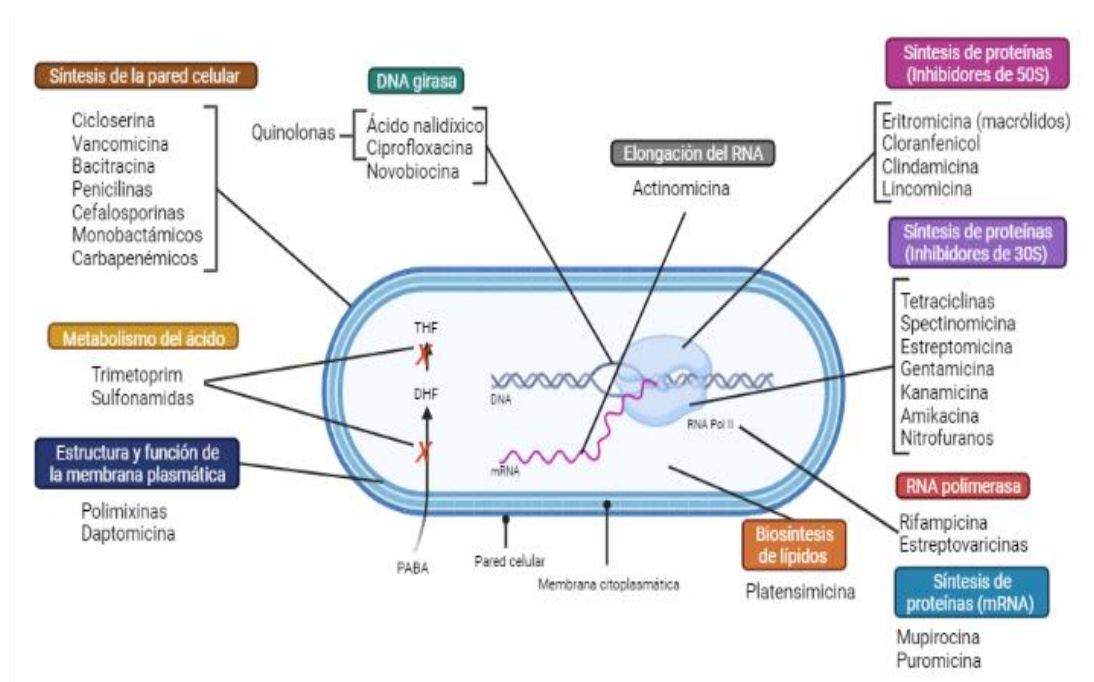
1.1.4. Antibióticos de importancia en medicina humana y veterinaria

Tras el continuo apareamiento de bacterias resistentes y el uso inadecuado de los agentes antimicrobianos presentes en el mercado, se ha optado por la combinación de dos o más antibióticos como una alternativa para tratar infecciones causadas por

bacterias resistentes, en este contexto los antibióticos empleados en la medicina humana y veterinaria se dividen en base a mecanismo de actividad antimicrobiana, entre estos están aquellos agentes que inhiben la síntesis de la pared celular, despolarizan la membrana celular, inhiben la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y vías metabólicas (**Figura 1**) (**Reygaert, 2018**).

Figura 1.

Dianas de los principales agentes antibacterianos



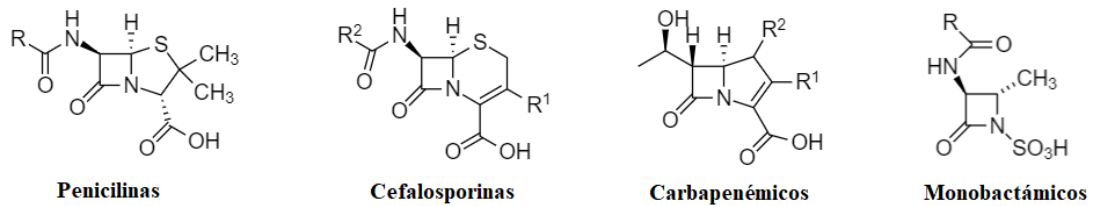
Nota: Los agentes antimicrobianos se clasifican en base a sus estructuras diana en la célula bacteriana. THF: tetrahidrofolato; DHF: dihidrofolato; PABA: ácido p-amino benzoico; mRNA: RNA mensajero. **Adaptado de: Madigan et al. (2015).**

Entre los antimicrobianos de importancia crítica en la medicina humana y veterinaria se encuentran los aminoglucósidos, ansamicinas, carbapenémicos, cefalosporinas, glicopéptidos, gliciliclinas, lipopéptidos, macrólidos, ketólidos, monobactámicos, oxazolidinonas, penicilinas, derivados del ácido fosfónico, quinolonas y medicamentos usados en el tratamiento de tuberculosis y otras infecciones micobacteriales (**WHO, 2017a**). No obstante, los antibióticos betalactámicos (**Figura 2**) son los antibióticos más usados a nivel clínico debido a su

alta actividad y efectos secundarios mínimos; además, de que en la actualidad representan el 65% del mercado total de antibióticos (Egorov et al., 2020; Pandey & Cascella, 2022).

Figura 2.

Estructuras de los principales grupos de antibióticos β -lactámicos



Estos antibióticos son usados para tratar una amplia gama de bacterias Gram positivas y Gram negativas, pero estos microorganismos pueden desarrollar resistencia mediante varios mecanismos; es así que, algunas cepas pueden adquirir resistencia por medio de mutaciones que disminuyen la afinidad de las Proteínas fijadoras de penicilinas (PBP) por el antibiótico, otras por medio de la disminución de la entrada o salida activa del antibiótico o gracias a la producción de β -lactamasas (MacDougall, 2018; Sykes & Papich, 2014).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Caracterizar los perfiles de resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* aislada de mamíferos en cautiverio del EcoZoológico “San Martín” – Baños de Agua Santa

1.2.2. Objetivos Específicos

- Aislar e identificar *E. coli* en muestras fecales de mamíferos del EcoZoológico “San Martín”.
- Evaluar los perfiles fenotípicos de resistencia antimicrobiana de los aislamientos de *E. coli* mediante la técnica de Kirby y Bauer.
- Analizar los perfiles de resistencia obtenidos en contraste con la información clínica y nutricional disponible de las diferentes especies de mamíferos estudiadas.

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA

La presente investigación es de **tipo cuantitativa** dado que se pretende recopilar y analizar datos cuantitativos sobre las variables a ser estudiadas, la **variable independiente** del estudio serán los mamíferos en cautiverio divididos en 23 especies diferentes presentes en la **Tabla 1**; mientras que la **variable dependiente** será el perfil de resistencia de cada aislado de *E. coli*, de acuerdo con su fenotipo de resistencia.

Las hipótesis para probar en la presente investigación son:

- **Hipótesis nula**

Los mamíferos en cautiverio del EcoZoológico “San Martín” no representan reservorios de aislamientos de *E. coli* multirresistente a antibióticos.

- **Hipótesis alternativa**

Los mamíferos en cautiverio del EcoZoológico “San Martín” representan reservorios de aislamientos de *E. coli* multirresistente a antibióticos.

Tabla 1.*Mamíferos en cautiverio del EcoZoológico “San Martín”*

Código por hábitat	Orden	Nombre común	Nombre científico	Número de individuos por hábitat	Alimentación	Estado	Tiempo en el zoológico	Tratamiento con antibióticos
C1-AD	Rodentia	Ardilla	<i>Sciurus vulgaris</i>	1	Omnívora	PM	2 años	Sí
E4-CCB	Primate	Mono capuchino cara blanca	<i>Cebus capucinus</i>	1	Omnívora	PE	8 años	No
	Primate	Mono cotoncillo rojo	<i>Callicebus discolor</i>	1	Omnívora	V	6 años	No
M10-CS	Carnívora	Cusumbo	<i>Potos flavus</i>	1	Omnívora	PM	1 año	Sí
E3-GV	Rodentia	Guatusa negra	<i>Dasyprocta fuliginosa</i>	1	Herbívora	PM	7 años	No
	Artiodactyla	Venado rojizo enano	<i>Mazama rufina</i>	1	Herbívora	PE	7 años	No
M18-GN	Rodentia	Guatusa negra	<i>Dasyprocta fuliginosa</i>	13	Herbívora	PM	6 años	No
M5-JG	Carnívora	Jaguar	<i>Panthera onca</i>	2	Carnívora	PE	4 años	No
M8-MP	Carnívora	Mapache	<i>Procyon cancrivorus</i>	1	Omnívora	PM	6 años	No
M3-MA	Primate	Mono araña	<i>Ateles belzebuth</i>	3	Omnívora	PE	9 años	No
M15-MA	Primate	Mono araña	<i>Ateles belzebuth</i>	2	Omnívora	PE	30 años	No
M13-MACM	Primate	Mono araña cabeza marrón	<i>Ateles fusciceps</i>	2	Omnívora	PE	8 años	No
M1-MNA	Primate	Mono ardilla	<i>Saimiri cassiquiarensis</i>	1	Omnívora	V	1 año	No

Código por hábitat	Orden	Nombre común	Nombre científico	Número de individuos por hábitat	Alimentación	Estado	Tiempo en el zoológico	Tratamiento con antibióticos
	Primate	Mono nocturno	<i>Aotus vociferans</i>	1	Omnívora	V	1 año	No
E5-MM	Primate	Mono capuchino	<i>Cebus yaracus</i>	1	Omnívora	V	2 años	No
	Primate	Mono maicero	<i>Sapajus apella</i>	1	Omnívora	PM	4 años	No
M16-MC	Primate	Mono capuchino blanco de occidente	<i>Cebus albifrons aequatorialis</i>	3	Omnívora	PE	10 años	No
M7-MCH	Primate	Mono chorongo	<i>Lagothrix lagotricha</i>	1	Omnívora	PE	1 año	No
M11-MN	Primate	Mono nocturno	<i>Aotus vociferans</i>	2	Omnívora	V	1 año	No
M17-OC	Carnívora	Ocelotes	<i>Leopardus pardalis</i>	2	Carnívora	CA	2 años	Sí
M19-OC	Carnívora	Ocelotes	<i>Leopardus pardalis</i>	2	Carnívora	CA	2 años	No
M20-OC	Carnívora	Ocelotes	<i>Leopardus pardalis</i>	1	Carnívora	CA	1 año	Sí
M12-OA	Carnívora	Oso de anteojos	<i>Tremarctos ornatus</i>	2	Omnívora	PE	9 años	Sí
M4-PC	Artiodactyla	Pecarí de Collar	<i>Dicotyles tajacu</i>	4	Omnívora	V	19 años	No
M6-PM	Carnívora	Puma	<i>Puma concolor</i>	2	Carnívora	PE	7 años	No
M9-TA	Carnívora	Taira	<i>Eira barbara</i>	2	Omnívora	PM	9 años	No
E2-TP	Perissodactyla	Tapir amazónico	<i>Tapirus terrestris</i>	5	Herbívora	PM	7 años	No
A2-TP	Perissodactyla	Tapir amazónico	<i>Tapirus terrestris</i>	2	Herbívora	PM	11 años	No
E1-TB	Carnívora	Tigre de Bengala Blanco	<i>Panthera tigris tigris</i>	2	Carnívora	PE	5 años	No

Código por hábitat	Orden	Nombre común	Nombre científico	Número de individuos por hábitat	Alimentación	Estado	Tiempo en el zoológico	Tratamiento con antibióticos
M2-VCB	Artiodactyla	Venado de cola blanca	<i>Odocoileus virginianus</i>	6	Herbívora	PE	8 años	No
M14-VRE	Artiodactyla	Venado rojizo enano	<i>Mazama rufina</i>	1	Herbívora	PE	7 años	No

V: vulnerable; PM: preocupación menor; PE: peligro de extinción; CA: casi amenazada. **Nota:** En el área de exóticos, los monos capuchino cara blanca y cotoncillo rojo comparten el hábitat E4; una guatusa negra y un venado rojizo enano comparten el hábitat E3; y los monos capuchino y maicero comparten el hábitat E5. En el área de mamíferos, los mono ardilla y nocturno comparten el hábitat M1. Los animales que comparten los hábitats E4, E5 y M1 son animales agrupados dentro del mismo orden; sin embargo, en el hábitat E3 comparten hábitat animales del orden Rodentia (guatusa negra) y orden Artiodactyla (venado rojizo enano).

2.1. Materiales

Tabla 2.

Equipos de laboratorio

EQUIPOS	CANTIDAD
Autoclave	1
Balanza analítica	1
Estufa bacteriológica +5°C-120°C	1
Incubadora	1
Mechero Bunsen	1
Nevera (4°C)	1
Congelador (-20°C)	1
Cabina de flujo laminar Bioseguridad 2	1
Microcentrífuga	1
Ultracongeladora	1
Vortex	1
Microscopio óptico	1

Tabla 3.

Materiales de laboratorio

MATERIALES	CANTIDAD
Caja de portaobjetos	2
Espátula	2
Asa de inoculación	4
Vasos de precipitación de 500 mL	8
Cajas mono Petri plásticas	1000
Pipetas x 25 mL	25
Gradilla	5
Juego de micropipetas	1
Puntas para micropipetas	1 de cada tipo
Tubos para microcentrífuga	1000

MATERIALES	CANTIDAD
Tubos de ensayo con tapa	60
Hisopos de plástico x 15 cm	400
Viales de criopreservación	200

Tabla 4.

Reactivos de laboratorio

REACTIVOS	CANTIDAD
Agar Levine	500 g
Agar MacConkey	500 g
CHROMagar mSuperCARBA	500 g
Caldo LB	500 g
Caldo TSB	500 g
Tampón PBS	500 g
Agua bidestilada	5 botellas
Glicerol	2 botella
Agar Muller - Hinton	500 g
Discos de antibióticos	1600
Ceftriaxona	1 g
Solución fisiológica	120 mL
Colorante violeta cristal	1 frasco
Agua destilada	6 botellón
Solución de yodo	1 frasco
Etanol – acetona	1 frasco
Solución de fucsina	1 frasco
Reactivo de Kovac	200 mg
Agar Citrato de Simmons	200 mg
Agua oxigenada	150 mg
Agar LIA	200 mg
Agar TSI	200 mg
Agar Urea de Christensen	200 mg

Tabla 5.*Insumos y materiales de escritorio*

INSUMOS Y MATERIALES	CANTIDAD
Termo de transporte 10 L	1
Cofias	caja x 100 unidades
Mascarillas	caja x 100 unidades
Guantes de examinación	3 cajas x 50 pares
Gafas protectoras (esterilizables)	2 unidades
Cinta testigo de esterilización	1 rollo
Cinta adhesiva auca de papel	2 rollos
Papel filtro	1 pliego
Papel de esterilización	6 pliegos
Papel aluminio	3 rollos
Hilo chillo	1 bobina 250 gr
Alcohol antiséptico	1 galón
Gel antibacterial	1 frasco
Jabón líquido	1 frasco
Cloro	1 galón
Algodón	1 bolsa x 500 gr
Gasa	1 Rollo 06 x 100 m
Computadora	1
Cámara fotográfica	1
Hojas de papel bond A4	1 paquete
Impresora	1
Esferos	5 unidades
Ficha para toma de muestras	50

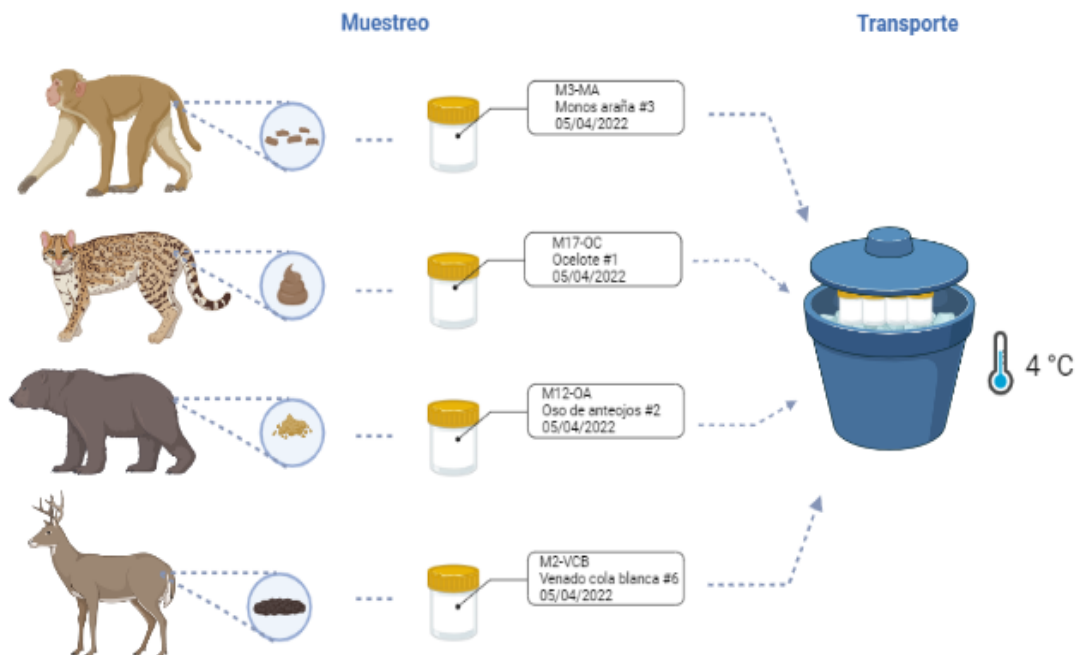
2.2. Métodos

2.2.1. Muestreo y transporte

Para la recolección de muestras se emplearon paletas de madera esterilizadas procurando que las heces obtenidas no hayan estado en contacto directo con el suelo. Posteriormente, se colocaron en un Coprotainer estéril debidamente rotulado con la información básica de la muestra (código que incluye el número de hábitat, especies presentes en el hábitat, número de individuos y fecha de muestreo). Una vez obtenidas las muestras estas fueron transportadas hacia el laboratorio en una caja isotérmica que mantuvo la temperatura a 4 °C.

Figura 3.

Protocolo de recolección y transporte de muestras

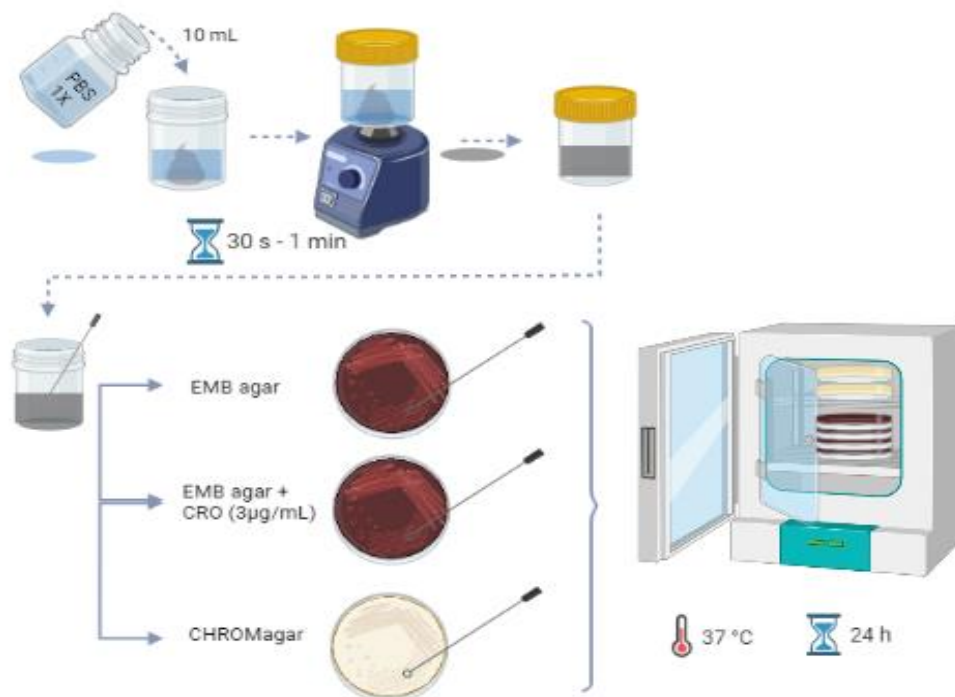


2.2.2. Aislamiento

Una vez finalizada la etapa de transporte, las muestras que se encontraban en el laboratorio fueron homogenizadas con el fin de resuspender las bacterias; para ello, a los Coprotainers estériles se les agregó 10 ml de tampón fosfato salino PBS 1x. Una vez realizada la resuspensión se procedió a aislar *E. coli* en medio selectivo, se realizaron siembras por estría escocesa en Agar Levine (agar eosina – azul de metileno (EMB)) suplementado con 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ceftriaxona y no suplementado, y en CHROMagar mSuperCARBA. Los aislados fueron incubados a 37 °C por 24 horas. Por cada muestra se recuperaron de 4 a 5 aislados con morfología presuntiva de *E. coli* que muestre resistencia a ceftriaxona o a carbapenémicos y 2 aislados de *E. coli* aislada de medio sin presencia de antibióticos

Figura 4.

Protocolo de aislamiento de E. coli

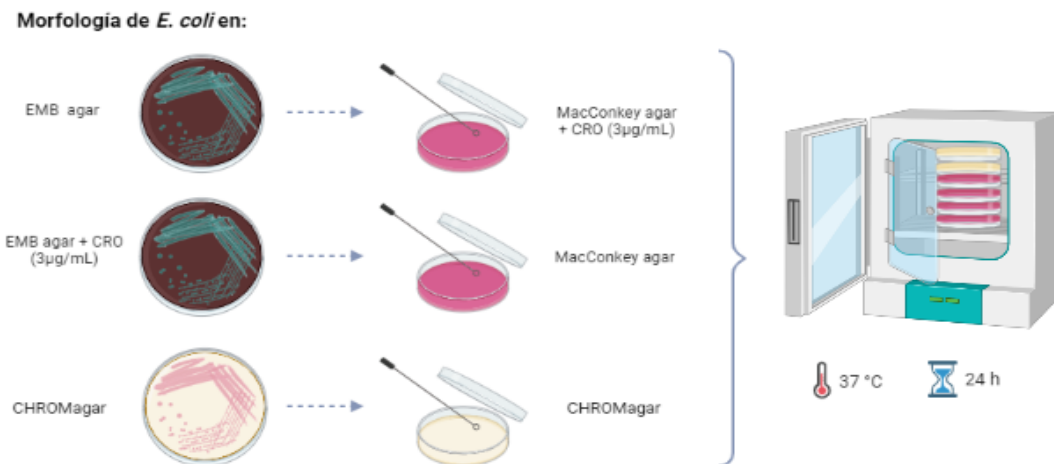


2.2.3. Purificación

Aquellas colonias que mostraron una coloración negro-azulado al trasluz y un verde brillante metalizado a la luz incidente (agar Levine) o que muestren una coloración rosa oscuro a rojo (CHROMagar) fueron identificadas como presuntivas *E.coli* (Krusei, 2021; Merck, 2008). Para continuar con el proceso de purificación, se tomaron 2 colonias del aislamiento realizado en agar Levine, de 4 a 5 colonias del aislamiento en agar Levine suplementado con antibiótico y se cultivaron en agar MacConkey. Las colonias aisladas en agar CHROMagar se purificaron en el mismo medio siguiendo el mismo proceso y condiciones de cultivo empleado para la etapa de aislamiento. En agar MacConkey aquellas colonias que desarrollaron un color rojo rosado brillante y que se vieron rodeadas por una zona de bilis precipitada se identificaron como colonias de *E.coli* (Aryal, 2018).

Figura 5.

Protocolo de purificación de E. coli



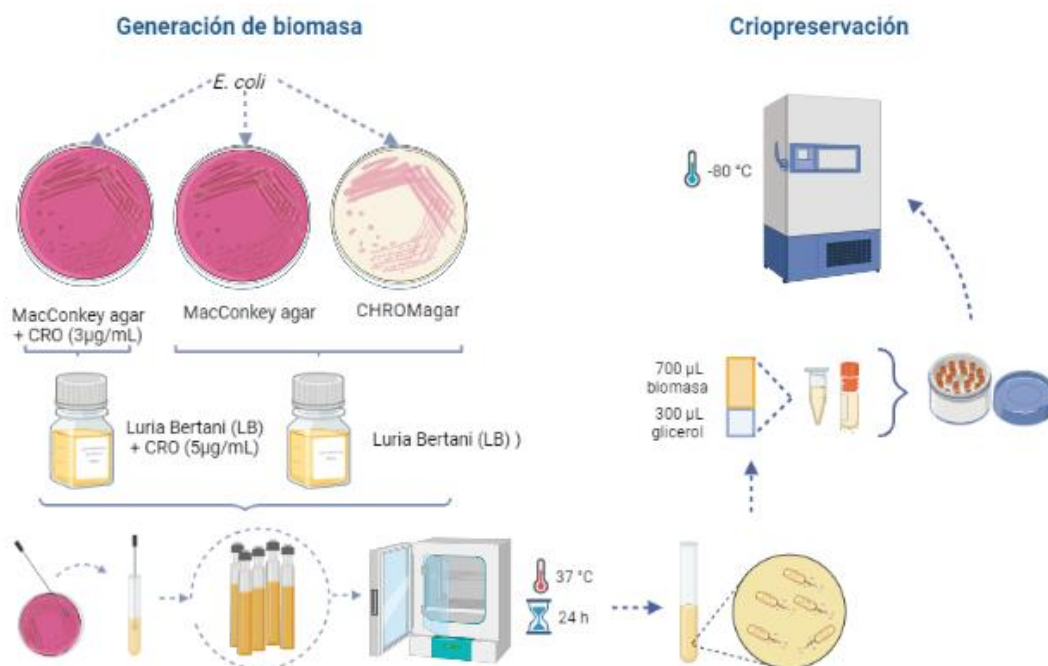
Finalmente, luego de observar el crecimiento en los medios de aislamiento, se tomaron aquellas colonias que presentaron las características deseadas, que se encontraban bien separadas de las demás y que poseían una morfología definida para la generación de biomasa para criopreservación (Literak et al., 2010).

2.2.4. Criopreservación

Una vez se logró purificar y aislar *E. coli*, las colonias positivas fueron criopreservadas para ello se tomó una colonia purificada y se sembró en 5 mL de caldo Luria Bertani (LB) sin antibiótico para las *E. coli* aisladas y purificadas en medio sin antibiótico y aisladas en medio CHROMagar, y en LB suplementado con 5 µg/mL de ceftriaxona para *E. coli* resistente a este antibiótico. Cada tubo se incubó durante 24 horas a 37°C. Posteriormente, con la finalidad de que las células se criopreserven adecuadamente se colocaron 700 µL de la biomasa líquida junto a 300 µL de glicerol para que actúe como agente criopreservante en viales de almacenamiento de 1.5 mL por stock capaces de soportar la temperatura de criopreservación de -80 °C (P. R. Murray et al., 2007).

Figura 6.

Protocolo de aislamiento de E. coli

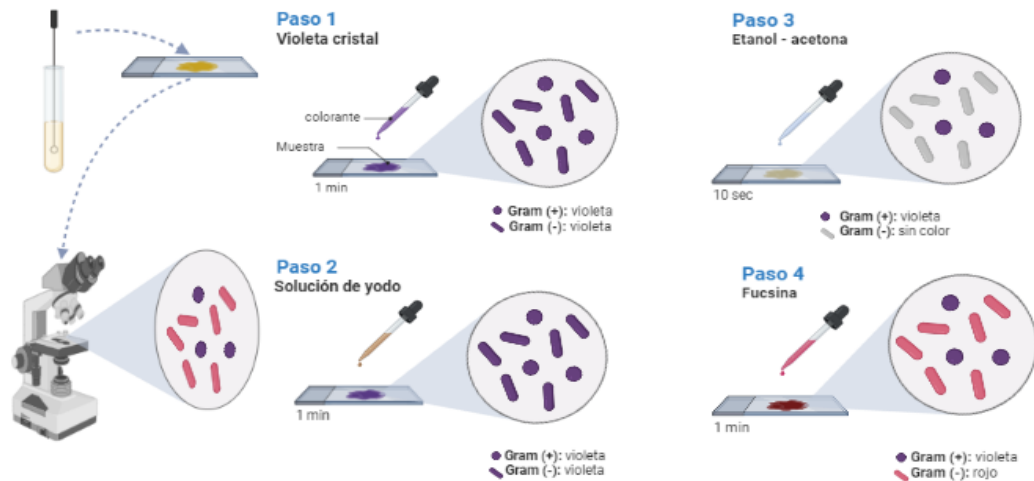


2.2.5. Identificación microscópica (Tinción Gram)

Para la confirmación y caracterización de las cepas de *E. coli* aisladas se emplearon técnicas de identificación como tinción Gram y pruebas bioquímicas. Para la tinción Gram se tomó una alícuota de la bacteria aislada con un asa de cultivo previamente estéril y se colocó en un portaobjetos, luego se agregó una gota de solución fisiológica y se fijó el frotis con la ayuda de un mechero. Se agregó colorante violeta cristal sobre el cultivo fijo y después de 1 minuto se retiró el exceso con agua. Luego, se usó una solución de yodo para cubrir el frotis durante 1 minuto y se enjuagó con agua. El exceso de agua de la superficie se sacudió. Posteriormente, se agregaron unas gotas de etanol-acetona y el portaobjetos se enjuagó con agua después de 10 segundos. El frotis se contra tiñó con una solución de fucsina por 1 minuto. La solución de fucsina se lavó con agua y el exceso de agua se secó para observar el frotis en el microscopio. *E. coli* se observó como bacilos de color rosa o rojo (Tripathi & Sapra, 2021).

Figura 7.

Protocolo de identificación microscópica mediante Tinción Gram



2.2.6. Identificación bioquímica

Por otro lado, se realizaron 6 pruebas bioquímicas con el fin caracterizar las colonias aisladas. La técnica de cada prueba junto con los resultados que debe presentar para *E. coli* se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 6.

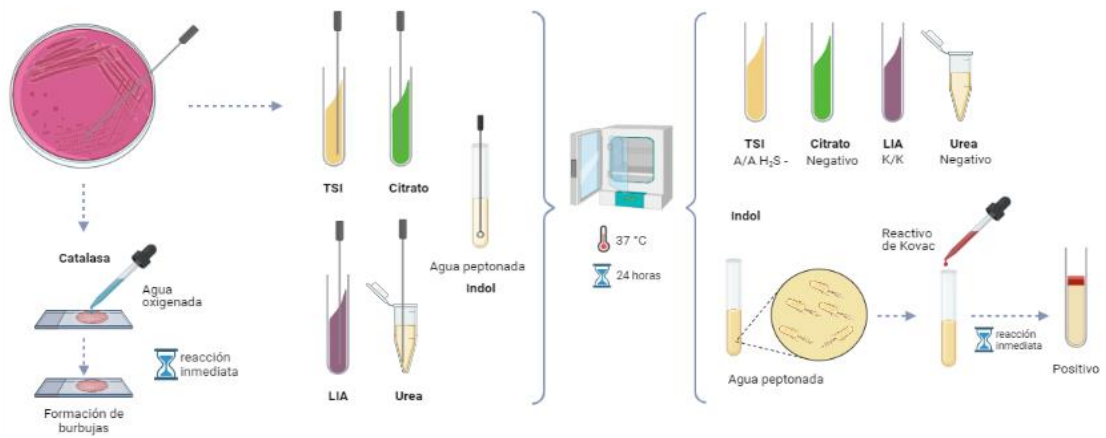
Pruebas bioquímicas para la caracterización de E. coli

Prueba	Técnica	Resultado para <i>E. coli</i>
Agar Hierro Triple Azúcar (TSI)	Se inoculó una colonia en el fondo del tubo con el medio mediante punción con la ayuda de una aguja de siembra previamente estéril y en la superficie del medio con estriado. Se incubó a 37 ° C por 24 horas.	A/A H ₂ S-
Citrato de Simmons		Verde (negativo)
Agar Lisina Hierro (LIA)		K/K H ₂ S-
Catalasa	Se tomó una sola colonia de cada aislado bacteriano y se colocó en un portaobjetos de vidrio limpio, luego se añadió una gota de peróxido de hidrógeno.	Presencia de burbujas
Producción de indol	Se inoculó una colonia en caldo de agua peptonada y se incubó a 37 ° C durante 24 horas. Después de la incubación, se agregó algunas gotas de reactivo de Kovac.	Formación de anillo rosa
Ureasa	Se tomó una sola colonia y mediante punción en la superficie del agar urea se inoculó la colonia y luego se incubó a 37 ° C por 24 horas.	Amarillo (negativo)

Fuente: MacFaddin (2004)

Figura 8.

Pruebas bioquímicas para la identificación de E. coli

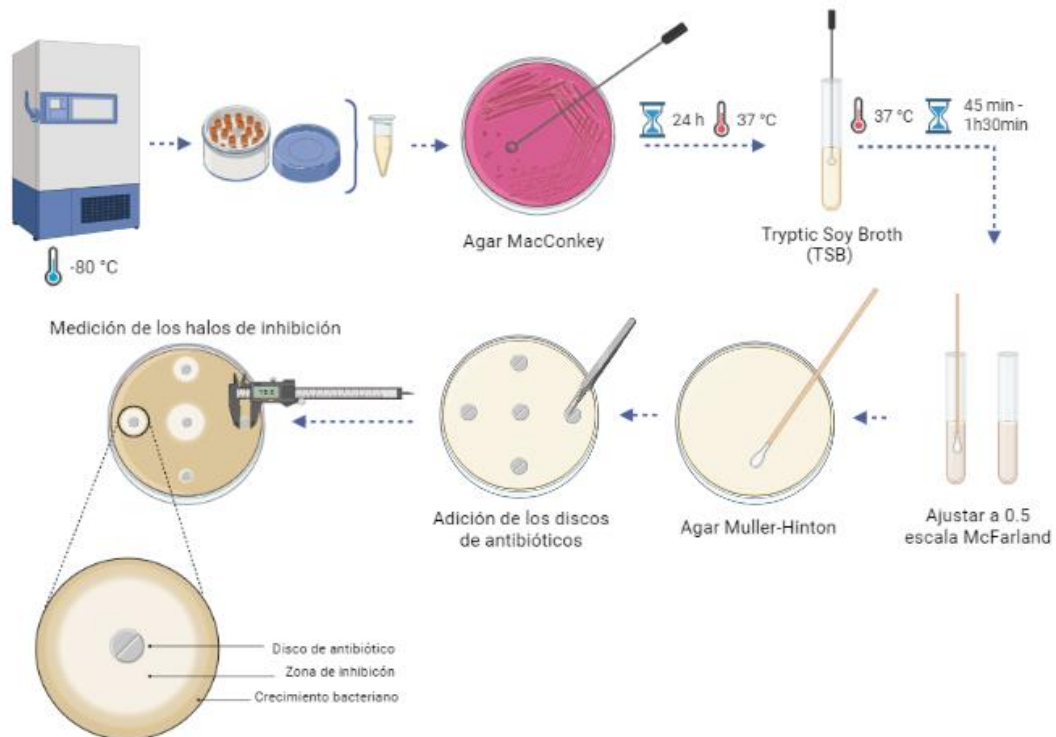


2.2.7. Pruebas de susceptibilidad

Los aislados de *E. coli* se analizaron para determinar la sensibilidad a los antibióticos amikacina (AK), amoxicilina/ácido clavulánico (AMC), ampicilina (AM), cefoxitina (FOX), ceftazidima (CAZ), ceftriaxona (CRO), cefuroxima (CXM), ciprofloxacina (CIP), ertapenem (ETP), fosfomicina (FF), gentamicina (CN), meropenem (MEM), nitrofurantoína (F), piperacilina/tazobactam (TZP), trimetoprima/sulfametoxazol (SXT) y cefepime (FEP). El presente panel de antibióticos se seleccionó considerando su uso en la evaluación de susceptibilidad para bacilos Gram negativos de importancia clínica (**Shnaiderman-Torban et al., 2019**). El método a aplicar se basa en difusión de discos en agar Mueller Hinton, de acuerdo a la técnica de Kirby y Bauer (**Hudzicki, 2009**). Los criterios de interpretación se basaron en las tablas vigentes del **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2021)**.

Figura 9.

Protocolo para pruebas de susceptibilidad a antibióticos



2.2.8. Interpretación de los perfiles fenotípicos

Para la interpretación de los perfiles fenotípicos en base a su susceptibilidad a antibióticos los aislados se reportaron como resistentes (R), intermedios (I) o sensibles (S) para cada antibiótico analizado según el Clinical and Laboratory Standard Institute 2021 (**Wang et al., 2012**). Posteriormente, se elaboraron mapas de calor usando el programa Multiexperiment viewer; a través de este programa los resultados del análisis se puede etiquetar con distintos colores y mostrarse uno al lado del otro en la misma vista para compararlos (**Howe et al., 2010**).

2.2.9. Fingerprinting (GTG)-5

El método genotípico Rep-PCR permite la diferenciación de microorganismos por medio de la amplificación de secuencias repetitivas palindrómicas, las cuales son consideradas altamente conservadas (**Bakhshi et al., 2020**). El genotipado basado en

(GTG)-5 funciona con un solo cebador de politrinucleótido (GTG) dirigido a secuencias poli GTG conservadas y repetitivas presentes en los genomas bacterianos. La eficacia del ensayo se ha considerado muy aceptable en comparación con otros análisis de tipificación molecular (**Babazadeh & Ranjbar, 2021; Kaboré et al., 2022; Lagha et al., 2021; Papalexandratou et al., 2009**). Para la ejecución de esta técnica, se utilizó la técnica descrita en el artículo de **Mohapatra et al., (2007)**. Se utilizó 12.5 µL de 2x Phusion U Green Multiplex PCR Master Mix, 0.25 µL del primer (GTG)-5 (5'-GTG-GTG-GTG-GTG-GTG-3') a una concentración de 30 µM, 11 µL de agua libre de nucleasas y 1.25 µL de DNA bacteriano procedente del choques térmicos, para lo cual se utilizó el protocolo descrito por **Sánchez-Salazar et al., (2019)**. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos con desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, alineamiento a 45°C por 1 minuto, elongación a 65°C por 8 minutos, elongación final a 65°C por 16 minutos y almacenamiento a 4°C hasta el análisis. Se realizó una electroforesis al 2% de agarosa utilizando TBE 1x a 90 V durante 5 horas y un marcador de peso molecular de 1 kb, posteriormente el gel fue teñido utilizando *SYBR® Safe DNA Gel Stain*. Los geles fueron analizados utilizando el programa GelJ. La similitud entre cepas se analizó mediante el índice de Dice, por el Método de Pares no Ponderados con algoritmo de promedios aritméticos (UPGMA). El archivo NEWICK generado fue posteriormente analizado utilizando el programa iTOL.

CAPÍTULO 3

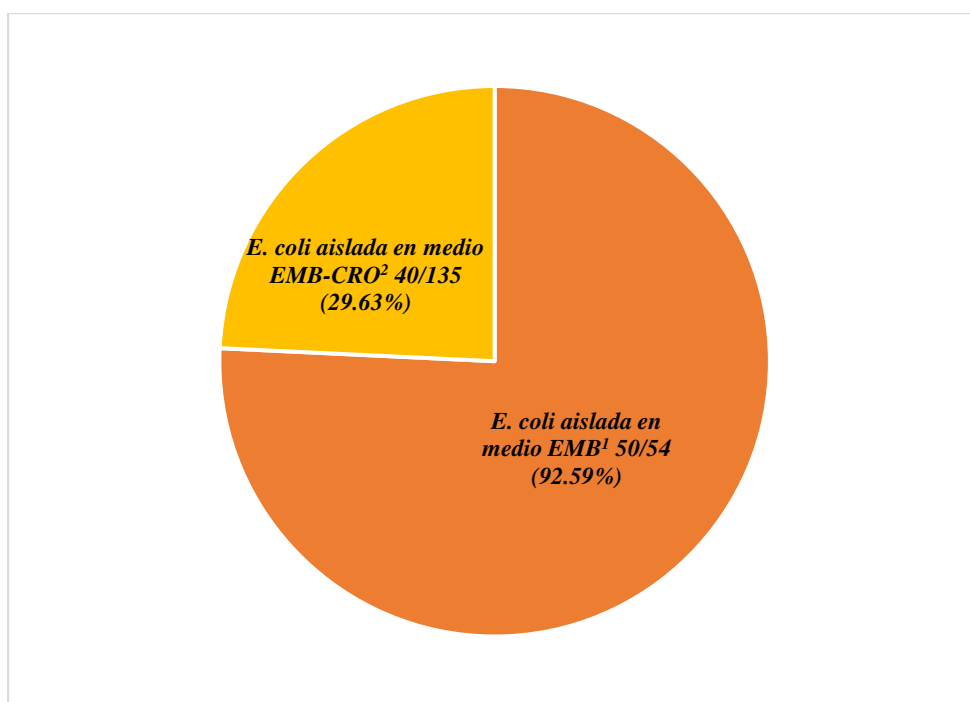
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. 1. Análisis y discusión de los resultados

3.1.1. Aislamiento de *E. coli* y dieta

Figura 10.

Frecuencia de aislamiento de E. coli aislada en medio EMB y EMB-CRO



¹ EMB: Medio de aislamiento (Eosin-Methylene Blue agar conocido como agar Levine)

² EMB-CRO: Medio EMB suplementado con ceftriaxona

En la presente investigación se aisló *E. coli* fecal de 27 diferentes secciones situadas en el área de exóticos, aviario y mamíferos del zoológico, en donde habitan un total de 70 mamíferos sanos de 27 especies diferentes (**Tabla 1**) utilizando agar Levine y agar MacConkey durante la etapa de aislamiento y purificación, respectivamente. En el medio EMB se obtuvo un porcentaje de aislamiento de 92.59% (n=50) (**Figura 10**). El objetivo fue aislar 2 bacterias por hábitat; no obstante, del hábitat C1 y M12 se

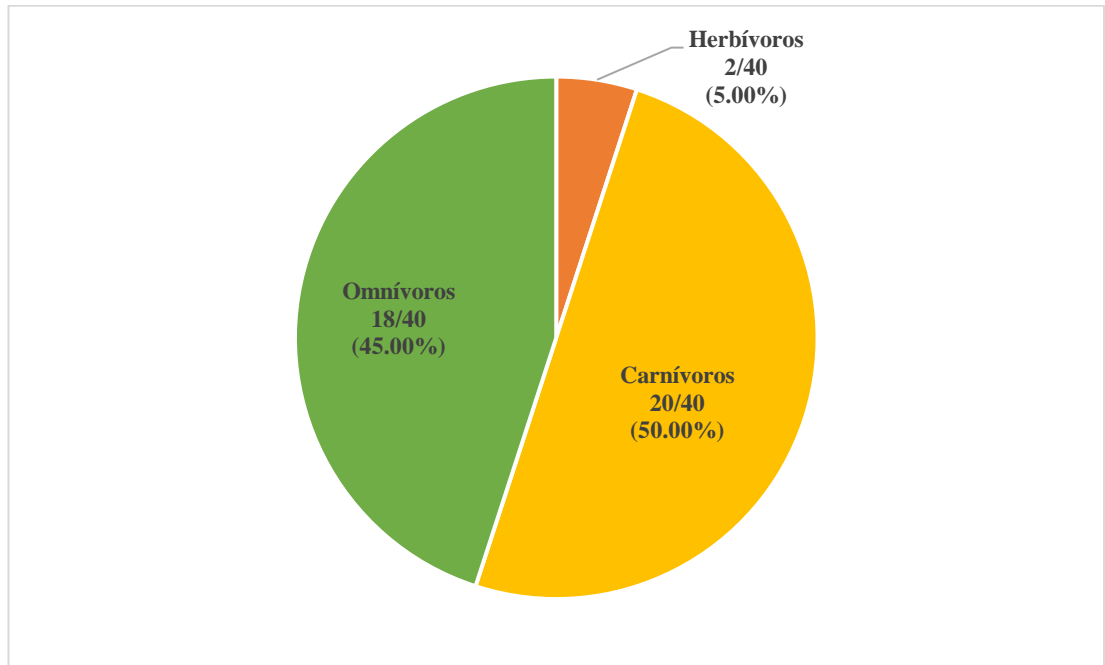
recuperó únicamente 1 aislado con morfología de *E. coli*, mientras que del hábitat M6 no se logró recuperar ninguna bacteria. Entre los factores que impidieron obtener aislados de *E. coli* de este hábitat se destaca la etapa de aislamiento en la cual la muestra obtenida presentaba un diverso número de otras especies bacterianas, las cuales impidieron la purificación de la bacteria de interés.

Por otro lado, en el medio EMB-CRO se recuperó un 29.63% (n=40) de aislados de *E. coli* (**Figura 10**). Respecto a estos aislados se tenía por objetivo obtener 5 aislados por cada hábitat, generando un total de 135 aislados; sin embargo, de las muestras recolectadas solamente se recuperó *E. coli* resistente a CRO de los hábitats A2, E1, E2, E4, M5, M6, M7, M8, M9, M16, M17, M19 y M20; y de estos, los hábitats M4 y M16 fueron los únicos de los cuales se logró recuperar cinco aislados, de E4, M5, M17, M19 y M20 se recuperó cuatro aislados, de M8 tres aislados, de E1 dos aislados y de M7, M9, E2 y A2 un solo aislado. La diferencia en el número de aislados obtenidos se debe a la concentración de antibiótico trabajada, la cual impidió el crecimiento de un gran número de *E. coli* en el medio. En la **Anexo 2** se detalla cada uno de los códigos asociados a cada aislado.

Las muestras fecales de los 27 hábitats muestreados fueron identificadas individualmente, y de cada hábitat se obtuvieron muestras homogéneas; sin embargo, al existir hábitats compartidos por animales de diferentes especies no fue posible identificar de cual animal provenían los aislados de *E. coli*. A pesar de ello, los hábitats compartidos eran ocupados por animales del mismo orden, lo cual permite agrupar a los aislados según el orden de los mamíferos que ocupan ese hábitat. Cabe mencionar que el único hábitat en donde existen especies de diferente orden es el hábitat E3, en el cual conviven una guatusa negra (Orden Rodentia) y un venado rojo enano (Orden Artiodactyla).

Figura 11.

Frecuencia de la influencia del tipo de alimentación en los aislados de E. coli en medio EMB-CRO



Respecto a la alimentación de los mamíferos estudiados, los 40 aislados de *E. coli* en medio EMB-CRO muestran que un 50.00% (n=20) de los aislados se recuperaron de animales con una dieta carnívora, un 5.0% (n=2) de animales con dieta herbívora y un 45% (n=18) obtenidos de animales con dieta omnívora (**Figura 11**). Los 40 aislados de *E. coli* resistente a ceftriaxona se obtuvieron de: tapires (*T. terrestris*) de la sección de aviario y exóticos, tigres de Bengala blancos (*P. tigris tigris*), mono cotoncillo rojo (*C. discolor*) y mono de cara blanca (*C. capucinus*) quienes comparten hábitat en la sección de exóticos, pecarís de collar (*D. tajacu*), jaguares (*P. onca*), pumas (*P. concolor*), mono chorongó (*L. lagotricha*), mapache (*P. cancrivorus*), tairas (*E. barbara*), cusumbos (*P. flavus*), monos capuchino blancos de occidente (*C. albifrons aequatorialis*) y ocelotes (*L. pardalis*).

Tabla 7.

Porcentaje de aislamiento en base a los hábitos alimenticios de los mamíferos del zoológico

Alimentación	Porcentaje de aislamiento
<i>EMB¹</i>	
Herbívoros	12/50 (24%)
Carnívoros	11/50 (22%)
Omnívoros	27/50 (54%)
<i>EMB suplementado con ceftriaxona</i>	
Herbívoros	2/40 (5%)
Carnívoros	20/40 (50%)
Omnívoros	18/40 (45%)

¹ EMB: Medio de aislamiento (Eosin-Methylene Blue agar conocido como agar Levine)

Respecto a los aislados obtenidos según la dieta de los mamíferos estudiados, de los 90 aislados de *E. coli* obtenidos con los medios EMB y EMB-CRO; 31 aislados provienen de mamíferos carnívoros, quienes son alimentados con carne, corazón e hígado de res proveniente del Camal Municipal de Ambato, cuyes criados en el EcoZoológico “San Martín” y pollos provenientes de un criadero en el cantón Baños de Agua Santa. Por otro lado, 45 aislados se clasificaron como aislados provenientes de mamíferos omnívoros, la dieta de estos animales está basada en vegetales y frutas obtenidas del Mercado Mayorista de Riobamba, la Plaza 5 de junio de Baños de Agua Santa y del bioterio del EcoZoológico “San Martín”, junto con el consumo de huevos, roedores, pollo, pescado o camarón. Los 14 aislados restantes se agruparon como aislados de mamíferos herbívoros. En el **Anexo 1** se detalla la dieta diaria que reciben los mamíferos estudiados.

3.1.2. Pruebas de susceptibilidad

La proporción de los aislado de *E. coli* resistente a antibióticos obtenidos usando el medio EMB y EMB-CRO se muestra en la **Tabla 8**. Todos los aislados en medio EMB fueron susceptibles a los antibióticos cefepime, ceftazidima, ceftriaxona, cefuroxima y fosfomicina; mientras que los aislados en medio EMB-CRO fueron susceptibles a los antibióticos cefoxitina, meropenem y amikacina. Por otro lado, en los aislados del

medio EMB-CRO se observan altos porcentajes de resistencia a ampicilina (97.5%), ceftriaxona (95%), cefuroxima (95%), trimetoprima/sulfametoxazol (52.5%), ceftazidima (47.5%) y ciprofloxacina (37.5%). La proporción de resistencia a los antibióticos para *E. coli* obtenida con el medio EMB fue significativamente menor que aquellos aislamientos de *E. coli* obtenidos con el medio EMB-CRO.

A través del análisis jerárquico los aislados se agruparon según su perfil de susceptibilidad a los antibióticos estudiados, obteniéndose 7 clústeres. Los 16 antibióticos evaluados en los 90 aislado de *E. coli* están clasificados dentro de las familias: agentes combinados β -lactámicos, penicilinas, β -lactámicos (cefalosporinas), carbapenémicos, aminoglucósidos, nitrofuranos, fosfomicinas, antagonistas de la vía del folato, quinolonas y fluoroquinolonas. Considerando estas familias, 32/90 cepas de *E. coli* presentaron resistencia a más de tres familias; no obstante, solo las cepas E57 y E75 aislada de ocelotes (*L. pardalis*) mostraron resistencia a seis familias de antibióticos, ubicándose en los clados C1 y C7, respectivamente (**Figura 12**).

Cabe destacar la relación fenotípica de los clados en donde se observa la presencia de una división en dos clados principales, a través de los cuales se logra establecer diferencias entre los clados C1, C2, C3 y C4; y los clados C5, C6 y C7. La diferencia se basa en los patrones de resistencia a los antibióticos estudiados donde los 4 primeros clados muestran una mayor susceptibilidad a estos; mientras que, los otros tres clados muestran mayor resistencia. Cabe recalcar que los aislados de los cuatro primero clados fueron aislados en medio EMB a excepción del aislado E2 que se aisló en medio EMB-CRO, al igual que los aislados de los clados C5, C6 y C7.

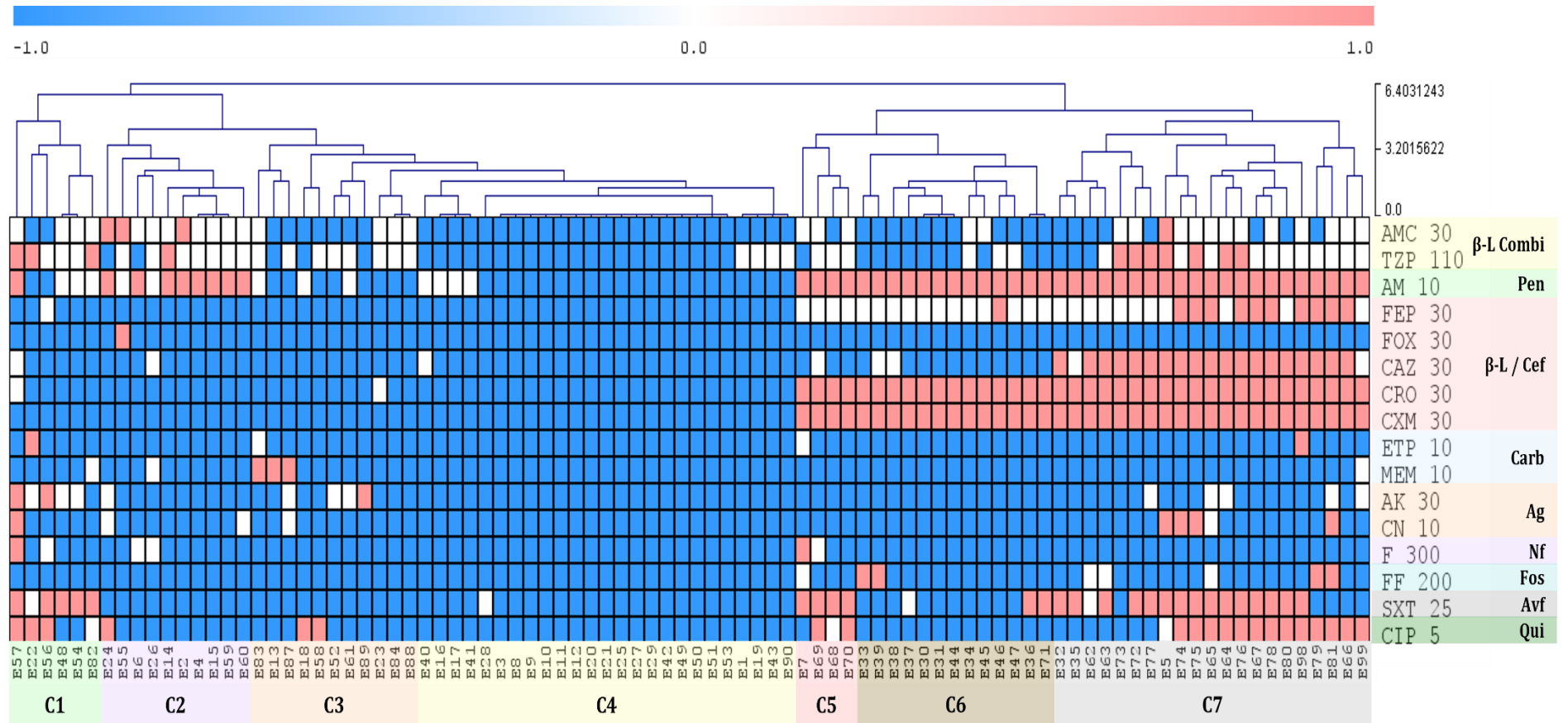
Tabla 8.*Resistencia antimicrobiana de los aislados de E. coli*

Familias de antimicrobianos	Agentes antimicrobianos	Abreviatura	Break Points (µg/mL)	Medio de aislamiento	
				EMB ¹ (n=50)	EMB – CRO ² (n=40)
Agentes combinados β-lactámicos	Amoxicilina/ácido clavulónico	AMC 30	18	2 (4%)	2 (5%)
	Piperacilina/Tazobactam	TZP 110	25	4 (8%)	7 (17.5%)
Penicilina	Ampicilina	AM 10	17	8 (16%)	39 (97.5%)
	Cefepime	FEP 30	25	0 (0%)	11 (27.5%)
	Cefoxitina	FOX 30	18	1 (2%)	0 (0%)
Cefalosporinas	Ceftazidima	CAZ 30	21	0 (0%)	19 (47.5%)
	Ceftriaxona	CRO 30	23	0 (0%)	38 (95%)
	Cefuroxima	CXM 30	18	0 (0%)	38 (95%)
	Ertapenem	ETP 10	22	1 (2%)	1 (2.5%)
Carbapenémicos	Meropenem	MEM 10	23	3 (6%)	0 (0%)
	Amikacina	AK 30	17	3 (6%)	0 (0%)
Aminoglucósidos	Gentamicina	CN 10	15	1 (2%)	4 (10%)
Nitrofuranos	Nitrofurantoina	F 300	17	1 (2%)	1 (2.5%)
Fosfomicinas	Fosfomicina	FF 200	16	0 (0%)	4 (10%)
Antagonistas de la vía del folato	Trimetoprima / Sulfametoxazol	SXT 25	16	5 (10%)	21 (52.5%)
Quinolonas y fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	CIP 5	26	6 (12%)	15 (37.5%)

¹ **EMB:** Medio de aislamiento (Eosin-Methylene Blue agar conocido como agar Levine)² **EMB – CRO:** EMB suplementado con ceftriaxona

Figura 12.

Perfil de resistencia fenotípica de E. coli aislada de muestras fecales de diferentes mamíferos



beta-L Combi: Agentes combinados beta-lactámicos; **Pen:** Penicilina; **beta-L/Cef:** beta-lactámicos (Cefalosporinas); **Carb:** Carbapenémicos; **Ag:** Aminoglucósidos; **Nf:** Nitrofuranos; **Fos:** Fosfomicinas; **Avf:** Antagonistas de la vía del folato; **Qui:** Quinolonas y fluoroquinolonas. Análisis jerárquico de conglomerados o clústeres

Dentro de los 4 primeros clados, el clado C4 destaca por no presentar resistencia a ningún antibiótico. Dentro de este clado se encuentran las cepas E1 y E3 (mono chorongo), E8 (puma), E9 (oso de anteojos), E10 y E11 (mono nocturno/mono araña), E12 (venado cola blanca), E16 y E17 (mono araña cabeza marrón), E19 (pecarí de collar), E20 y E21 (mapache), E25 (cusumbo), E27 (venado rojizo enano), E28 y E29 (mono capuchino), E40 y E41 (guatusa negra), E42 y E43 (mono nocturno), E50 y E51 (mono maicero/mono capuchino), E53 (jaguar) y E90 (tapir). A pesar de no presentar resistencia, el aislado E40 presentó susceptibilidad intermedia a los antibióticos ampicilina y ceftazidima, los aislados E16, E17 y E41 a la ampicilina, E28 a trimetoprima/sulfametoxazol y E1, E19, E43 y E90 a la piperacilina/tazobactam (**Figura 12**).

El clado C3 contiene los aislados E13 (venado cola blanca), E18 (pecarí de collar) E23 (taira), E52 (jaguar), E58 (ocelote), E61 (mono araña), E83 (guatusa negra/venado rojizo enano), E84 (ardilla) y E87, E88 y E89 (tapir), a diferencia del clado C4 en este clado ya se observan cepas con resistencia y susceptibilidad intermedia. Los aislados E83, E13 y E87 presentaron resistencia al carbapenémico meropenem, E18 y E58 a la quinolona ciprofloxacina y E89 al aminoglucósido amikacina. Por otro lado, a excepción de los aislados E13, E18 y E89 todos mostraron susceptibilidad intermedia a piperacilina/tazobactam, en el caso del β -lactámico combinado amoxicilina/ácido clavulánico únicamente los aislados E83, E23, E84 y E88 mostraron susceptibilidad intermedia, a la ampicilina los aislados E83, E18 y E61. E83 también mostró susceptibilidad intermedia al carbapenémico ertapenem, E87 a la gentamicina y amikacina, E52 y E61 a la amikacina y E23 a la cefalosporina de tercera generación ceftriaxona (**Figura 12**).

El clado C2 presenta aislados que poseen un patrón de resistencia similar en este se observa cepas de *E. coli* con resistencia a más de un antibiótico; es así como, los aislados E2 (mono chorongo), E4 y E6 (tigre blanco), E14, E15 y E60 (mono araña), E24 (cusumbo), E26 (venado rojizo enano) y E55 y E59 (ocelote), de estos a excepción de los aislados E55 y E26 que presentaron susceptibilidad intermedia, los otros

aislados presentaron resistencia a la ampicilina. El aislado E24 además presentó resistencia a amoxicilina/ácido clavulánico y a ciprofloxacina, E55 mostró resistencia a amoxicilina/ácido clavulánico y cefoxitina, E14 y E2 a los β -lactámicos combinados amoxicilina/ácido clavulánico y piperacilina/tazobactam, respectivamente, mientras que los otros aislados presentaban susceptibilidad intermedia a estos. El aislado E26 a pesar de no haber mostrado resistencia a ningún antibiótico mostró susceptibilidad intermedia a los agentes β -lactámicos combinados, a la cefalosporina de tercera generación ceftazidima, al carbapenémico meropenem y a la nitrofurantoína. Otro de los aislados que presentó susceptibilidad intermedia fueron E24 a los aminoglucósidos amikacina y gentamicina, E55 a piperacilina/tazobactam y ampicilina, E6 a nitrofurantoína y E60 a gentamicina (*Figura 12*).

El clado C1 está formado por los aislados E22 (taira), E48 (mono capuchino cara blanca/mono cotoncillo rojo), E54, E56 y E57 (ocelote) y E82 (guatusa negra/venado rojizo enano). A excepción del aislado E22 que presentó sensibilidad intermedia, los otros aislados mostraron resistencia al antibiótico trimetoprima/sulfametoxazol; por otro lado, de estos el aislado E57 también mostró resistencia a los antibióticos piperacilina/tazobactam, ampicilina, amikacina, gentamicina, nitrofurantoína, y ciprofloxacina, junto con sensibilidad intermedia a los antibióticos amoxicilina/ácido clavulánico y a las cefalosporinas de tercera generación ceftazidima y ceftriaxona. El aislado E22 mostró resistencia a los antibióticos piperacilina/tazobactam, ertapenem y ciprofloxacina, y sensibilidad intermedia a la amikacina. La cepa E56 presentó resistencia a los antibióticos amikacina y ciprofloxacina, junto con sensibilidad intermedia a piperacilina/tazobactam, cefepime y nitrofurantoína. E48 y E54 mostraron sensibilidad intermedia a los agentes β -lactámicos combinados, ampicilina y amikacina; mientras que el aislado E82 mostró sensibilidad intermedia a amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina, meropenem y ciprofloxacina (*Figura 12*).

En el clado 5 se agrupan los aislados E7 (tigre blanco) y E69, E68 y E70 (mono capuchino cara blanca/mono cotoncillo rojo), mismo que muestran resistencia a los antibióticos ampicilina, ceftriaxona, cefuroxima y trimetoprima/sulfametoxazol; de

forma individual, E7 es resistente a la nitrofurantoína y E69 con E70 a la ciprofloxacina. Por otra parte, todos los aislados presentan sensibilidad intermedia a la cefalosporina de cuarta generación cefepime y a los β -lactámicos combinados amoxicilina/ácido clavulánico a excepción del aislado E68 y piperacilina/tazobactam a excepción del aislado E7; además, este aislado presenta sensibilidad intermedia a los antibióticos ertapenem y fosfomicina. E69 presenta una sensibilidad intermedia a la ceftazidima y a la nitrofurantoína, y E68 a la ciprofloxacina (**Figura 12**).

El clado C6 agrupa a los aislados E30, E31, E44, E45 y E46 (pecarí de collar), E33, E34 y E47 (mapache), E36, E37, E38 y E39 (mono capuchino) y E71 (jaguar). Al igual que en el clado C5, todas las cepas muestran resistencia a los antibióticos ampicilina, ceftriaxona y cefuroxima, en tanto que, estos presentan sensibilidad intermedia a cefepime, a excepción de la cepa E46, la cual muestra resistencia. Las cepas E33 y E39 también mostraron ser resistentes a la fosfomicina, y las cepas E36 y E71 a la trimetoprima/sulfametoxazol. Por otra parte, las cepas E39 y E38 mostraron ser sensibles intermedios a la ceftazidima, E37 a la trimetoprima/sulfametoxazol, E34, E46 y E47 a la piperacilina/tazobactam y E34 junto a E45 a la amoxicilina/ácido clavulánico. En general en este clado la sensibilidad intermedia va disminuyendo en comparación con otros clados y se muestra un patrón de resistencia a los antibióticos estudiados (**Figura 12**).

El clado C7 agrupa aislados que presentan patrones de resistencia más específicos, en este clado se encuentran las cepas E5 (tigre blanco), E32 (taira), E35 (mono capuchino), E62, E63, E64, E65, E66, E75, E76, E77, E78, E79, E80 y E81 (ocelote), E67 (mono capuchino cara blanca/mono cotoncillo rojo), E72, E73 y E74 (jaguar), y E98 y E99 (tapir); todas estas presentaron resistencia a los antibióticos ampicilina, ceftriaxona y cefuroxima. También mostraron resistencia al β -lactámico ceftriaxona, a excepción de los aislados E35 y E99 que mostraron sensibilidad intermedia. Otro a los antibióticos que mostraron resistencia fue a la trimetoprima/sulfametoxazol; sin embargo, la cepa E62 mostró sensibilidad intermedia y las cepas E73, E79, E81, E66 y E99 presentaron ser sensibles a esta. Algo similar sucede con el antibiótico

ciprofloxacina, para el cual las cepas E33, E35, E62, E63, E73, E72 y E77 son sensibles y E5 es sensible intermedio (**Figura 12**).

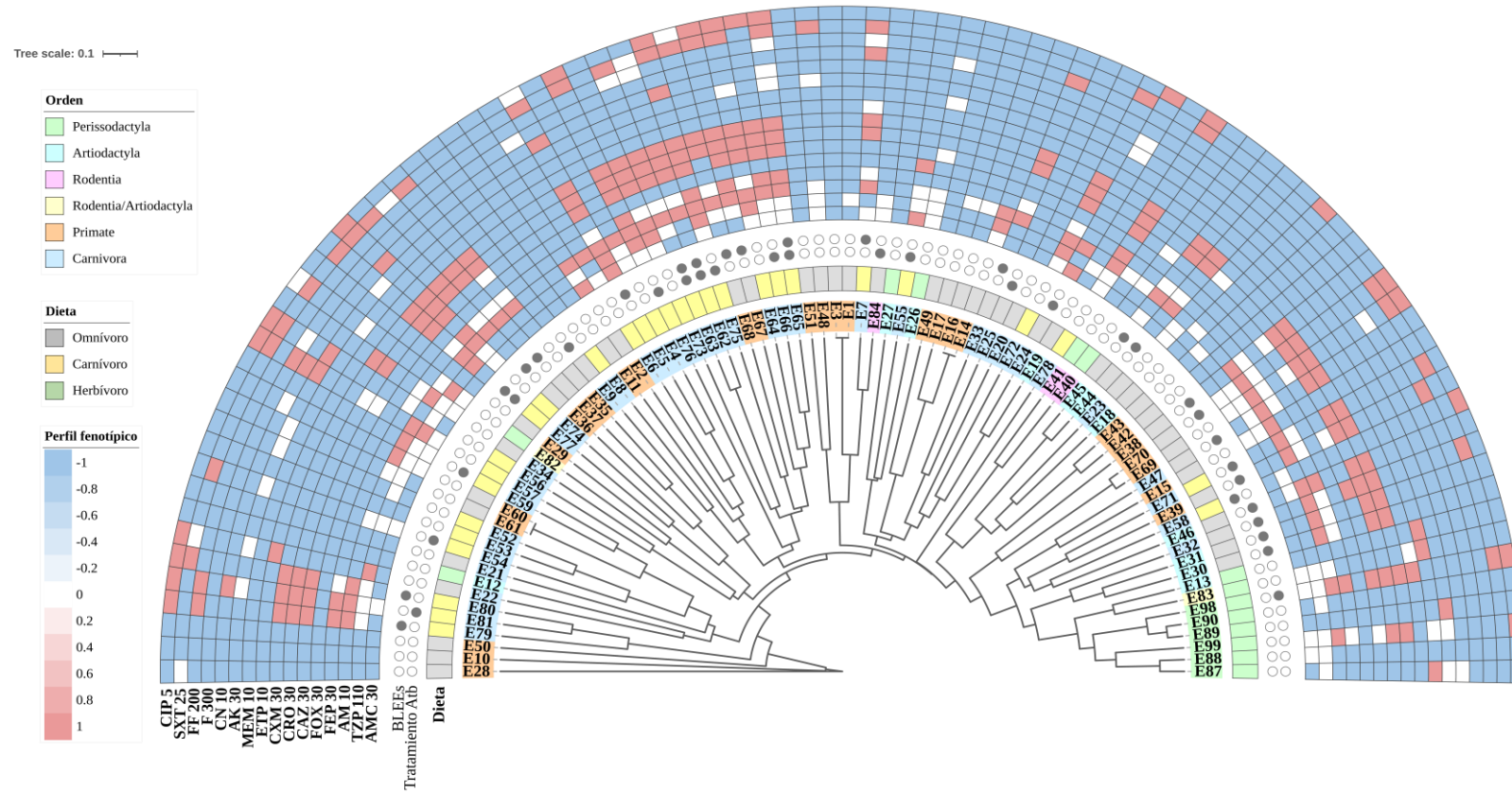
Otro de los antibióticos a los cuales las cepas presentan resistencia es la cefalosporina cefepime, no obstante, los aislados E33, E35, E62, E63, E73, E72, E77, E5, E64, E80 y E99 son sensibles intermedios a esta. Un patrón similar se presenta con el β -lactámico combinado piperacilina/tazobactam, para este los aislados E33, E35 y E62 muestran ser sensibles, las cepas E73, E72, E77 y E5 ser resistentes, y las demás presentar susceptibilidad intermedia. Respecto a la amoxicilina/ácido clavulánico solo el aislado E5 mostró ser resistente, mientras que, los otros mostraron ser sensibles (E32, E35, E62, E63, E77, E67, E80 y E79) y sensibilidad intermedia (E73, E72, E74, E75, E65, E64, E76, E78, E98, E81, E66 y E99). Algunas cepas también presentaron resistencia a ertapenem (E98), gentamicina (E5, E74, E75 y E81) y fosfomicina (E79 y E81); y otras mostraron sensibilidad intermedia a meropenem (E99), amikacina (E77, E65, E64, E81 y E99), fosfomicina (E62, E63 y E65) (**Figura 12**).

3.1.3. Fingerprint rep-PCR (GTG5).

La amplificación del ADN de las cepas de *E. coli* con el primer GTG5 reveló una diversidad genotípica alta entre los aislados. Los perfiles obtenidos a través de electroforesis mostraron un *fingerprint* que generó distintas bandas de amplificación que variaron en tamaño desde 10000 pb hasta 1000 pb. Los perfiles obtenidos permitieron agrupar las 90 cepas en 8 clados, lo cual indica una diversidad genética considerable, con un porcentaje de similitud máximo del 50% (**Anexo 7**). No existió una correlación entre la diversidad clonal, los perfiles fenotípicos de resistencia o la especie de la cual se obtuvieron los aislados; no obstante, varias cepas con un mismo perfil fenotípico mostraban *fingerprints* idénticos (**Figura 13**).

Figura 13.

Dendrograma obtenido por análisis de conglomerados de fingerprint rep-PCR (GTG5) y metadatos complementarios



Tratamiento Atb: Tratamiento con Antibióticos. El dendrograma se basa en el Coeficiente de similitud de Dice con el método de grupo de pares no ponderados con algoritmo de agrupamiento de promedios aritméticos (UPGMA). **Nota:** La categoría taxonómica Orden no se escribe en cursiva.

Además de obtenerse un perfil filogenético de los aislados se realizó una identificación de cepas con fenotipo BLEE, esto con el objetivo de conocer si los 90 aislados son productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), esto se realizó mediante la prueba de sinergia de doble disco usando amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) y las cefalosporinas de segunda generación (cefuroxima), de tercera generación ceftazidima y ceftriaxona y de cuarta generación (cefepime). Se observó la producción de BLEEs en el 27.78% de los aislados (25/90) y de todas estas 9 de estos aislados provenían de animales que poseen una dieta basada en cárnicos; mientras que, 15 aislados de animales con una dieta mixta y un aislado de animales con una dieta herbívora. Por otro lado, solo tres aislados que mostraron ser BLEE positivos provenían de ocelotes (*L. pardalis*) que habían recibido tratamiento con antibióticos, esta información se encuentra incluida en el dendrograma generado mediante un análisis de conglomerados de fingerprint rep-PCR (GTG5) (**Figura 13**).

Al dendrograma generado en el programa iTOL se le agregó información respecto a la dieta y tratamiento de las especies huésped de los aislados obtenidos. Respecto al tratamiento, de los 70 diferentes mamíferos analizados: la ardilla (*S. vulgaris*), el cusumbo (*P. flavus*) y uno de los osos de anteojos (*T. ornatus*) habían recibido tratamiento con antibióticos en el zoológico dentro de un periodo de 12 meses; a la ardilla ubicada en el área de cuarentena se le administró enrofloxacin por 7 días, el cusumbo fue tratado con enrofloxacin + meloxicam y doxiciclina por 5 días antes de su traslado al hábitat 10 en la sección de mamíferos. El hábitat 12 en la sección de mamíferos está ocupado por dos osos de anteojos “Bruno” y “Sangay”, de estos dos “Bruno” recibió enrofloxacin + ceftriaxona por 7 días.

Por otro lado, dentro del periodo de 12 meses un ocelote bebé (*L. pardalis*) antes de su llegada al zoológico es tratado en el Hospital de Fauna Silvestre TURI – USFQ, allí recibe ampicilina/sulbactam durante 8 días y metronidazol por un día; tras su llegada al zoo es ubicado en el hábitat 20 en la sección de mamíferos. Otros dos ocelotes (*L. pardalis*) habían sido tratado con anterioridad en el Hospital de Fauna Silvestre TURI – USFQ antes de su traslado al zoológico; sin embargo, el tratamiento

se llevó a cabo en el 2018. Uno de ellos recibió tratamiento por una secreción ocular (ojo derecho) junto con una fractura de tibia y tarso en el miembro anterior derecho (MAD) y miembro anterior izquierdo (MAI), a su ingreso al hospital se le administró metronidazol durante 8 días, en su segundo día de ingreso recibió metronidazol y ampicilina, este último se le administra durante 2 días. En el transcurso de su estancia en el hospital con el fin de tratar su infección ocular se le administra tobramicina oftálmica por 4 días. El otro ocelote fue tratado por una fractura de tibia y peroné expuesta en el miembro posterior izquierdo (MPI); sin embargo, no se guarda registro del tratamiento de este ocelote. Por otro lado, estos dos ocelotes llegan al zoológico en el 2020 y comparten un mismo hábitat (hábitat 17 en la sección de mamíferos).

La microbiota gastrointestinal juega un papel crucial en el mantenimiento de la salud animal, su composición y dinámica está determinada por diversos factores entre los que se incluyen la genética, edad, dieta, interacciones y el ambiente. No obstante, el estudio de esta se ha centrado en la microbiota de humanos y animales domésticos. Esto ha llevado a que la microbiota de animales salvajes sea poco estudiada a pesar de su papel como posibles reservorios de agentes zoonóticos (**Dolejska, 2020**). Con el paso de los años se ha identificado que los patógenos que causan infecciones en humanos tienen un origen animal y que los animales silvestres sirven como reservorios para estos patógenos, favoreciendo así su transmisión (**González-Barrio, 2022**).

El presente estudio documenta la presencia de *E. coli* en mamíferos en cautiverio como potencial fuente de microorganismos multirresistentes a antibióticos. Los perfiles de resistencia varían entre las especies (**Figura 13**). Este es el primer reporte de los perfiles de resistencia a antibióticos en aislados de *E. coli* en mamíferos en cautiverio sanos en Ecuador presentes en zoológicos; una investigación paralela desarrollada en la provincia de Napo, en la cual se recolectaron aislados de *E. coli* procedente de un grupo de capuchinos de frente blanca de Humboldt (*Cebus yacus*) los cuales mostraron aislamientos resistentes a ampicilina en un 53,84%, y a trimetoprima/sulfametoxazol en un 23,08%, además de, susceptibilidad intermedia a cefuroxima 100% y ciprofloxacina 53,85% (**Haro-León et al., 2020**). No obstante, el

estudio se enfoca en una sola especie, mientras que la presente investigación abarca un número de especies más amplio.

Estudios anteriores en otros países como Perú y Colombia han mostrado que las especies en cautiverio como *Ateles belzebuth*, *Ateles chamek*, *Callicebus oenanthe*, *Lagothrix cana* y *Lagothrix lagotricha* hospedan cepas de *E. coli* con alta resistencia a cefalotina (KF) (46.2%), ampicilina/ácido clavulánico (31.1%), tobramicina (TOB) (30.2%) y tetraciclina (24.5%); y con alta sensibilidad a ceftriaxona (93.3%), ampicilina/sulbactam (86.7%), trimetoprima/sulfametoxazol (84.4%) y amikacina (80.0%) De la misma forma, zaínos (*Pecari tajacu*), tigrillos (*Leopardus tigrina*), tairas (*E. barbara*), monos cariblanco (*Cebus albifrons*), monos copete (*Cebus apella*), monos aulladores (*Alouatta seniculus*), dantas (*Tapirus terrestris*) y titís gris (*Saguinus leucopus*) sirven como reservorios para cepas de *E. coli* con resistencia completa a ampicilina y ampicilina/sulbactam, oxitetraciclina (OT), ciprofloxacina, cefotaxima y ceftazidima (**Medina et al., 2017; Vargas et al., 2010**).

Otro de los países en donde se ha registrado aislados de mamíferos en cautiverio son México, Canadá y Bélgica. En los estudios realizados en México se observó que en monos araña (*Ateles geoffroyi*), tapires (*Tapirus bairdii*), jaguares (*P. onca*), pumas (*P. concolor*) y ocelotes (*L. pardalis*) los aislados de *E. coli* muestran resistencia a los antibióticos ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, cloranfenicol, sulfadiazina, ciprofloxacina y tetraciclina (**Cristóbal-Azkarate et al., 2014**). Por otro lado, en Canadá el estudio llevado a cabo en mapaches (*Procyon lotor*) del zoológico de Toronto mostró que estos animales son capaces de albergar *E. coli* con una susceptibilidad reducida a los antibióticos tetraciclina, amoxicilina/ácido clavulánico, cefoxitina, ceftiour, ceftriaxona y ciprofloxacina; mientras que, los estudios en Bélgica se realizaron en jaguares (*P. onca*), tigres de bengala (*P. tigris tigris*) y osos de anteojos (*T. ornatus*) encontrándose *E. coli* con un porcentaje de multiresistencia del 64%, mostrando resistencia a trimetoprima/sulfametoxazol, tetraciclina, doxiciclina, estreptomomicina, trimetoprima, enrofloxacin y gentamicina (**De Witte et al., 2021; Jardine et al., 2012**). La presente investigación mostró resultados similares a los

presentados en otras investigaciones donde se estudian las mismas especies o especies del mismo orden; sin embargo, los resultados también muestran que el porcentaje de multirresistencia es menor en comparación con otros estudios.

Estas diferencias están marcadas por diferentes factores. Con anterioridad **Ishihara et al. (2012)** realizaron un estudio enfocado en los factores asociados a la resistencia antimicrobiana de aislados de *E. coli* en mamíferos en cautiverio, en esta descubrieron que aquellos animales que habían recibido con anterioridad tratamiento con antibióticos presentaban porcentajes de resistencia más altos que aquellos animales no tratados; en su investigación, los aislados mostraban resistencia a la ampicilina, antibióticos de la familia de los aminoglucósidos, tetraciclina y trimetoprima, a pesar de ser antibióticos que raramente eran administrados.

En el zoológico de Baños de Agua Santa ocurre una situación similar, los antibióticos en los cuales se observó resistencia fueron la ampicilina, ceftriaxona, cefuroxima, trimetoprima/sulfametoxazol, ceftazidima y ciprofloxacina. No obstante, los antibióticos usados como primera línea de tratamiento son enrofloxacin, doxiciclina, ceftriaxona, ampicilina/sulbactam, metronidazol, ampicilina y tobramicina. Los datos presentados describen la evolución de la resistencia después de la introducción de nuevos agentes antibióticos. Este fenómeno se había observado con anterioridad en estudios enfocados en animales destinados a la producción de lácteos (**Azabo et al., 2022**), en muestras de humanos y de animales de consumo (**Tadesse et al., 2012**), e incluso en bacterias aisladas de animales muertos (**Bourély et al., 2019**).

Baros-Jorquera et al. (2021) realizaron una investigación en un centro de rescate de animales silvestres, en su estudio observaron diversos perfiles de resistencia a antibióticos en *E. coli*, esta demostró ser resistente a más de nueve antibióticos de distintas familias. Aquí se menciona el tiempo de tratamiento como uno de los factores de multirresistencia, se observó que el periodo de tratamiento influyó en el número de antibióticos a los cuales las cepas adquirieron resistencia. Es importante mencionar

que los resultados obtenidos demuestran que los porcentajes de resistencia más altos se observan en aquellos antibióticos que han sido usados por más tiempo en la medicina humana y veterinaria (**Galindo-Méndez, 2020**).

En lo que se refiere a la alimentación de las diferentes especies de mamíferos y los patrones de resistencia de los aislados de *E. coli*, un estudio realizado en el *Emperor Valley Zoo* en Trinidad y Tobago muestra la relevancia de los diferentes tipos de alimentación y la influencia del ambiente entre los aislados de diferentes especies. La frecuencia de aislamiento de *E. coli* fue significativamente mayor en mamíferos en comparación con aves y reptiles; y de un total de 404 muestras obtenidas de recintos de mamíferos 72,0 % provenían de carnívoros y 76,6 % fueron recolectadas de herbívoros (**Gopee et al., 2000**). Estos datos demuestran que la alimentación juega un papel importante en los hallazgos realizados; no obstante, difieren con los aislados del zoológico “San Martín”, dado que estos presentaron un porcentaje de resistencia significativamente alta en cepas aisladas de mamíferos con una dieta carnívora.

De forma global, el uso de antibióticos destinados al sector veterinario y zootécnico abarca el 80% de la producción mundial, aproximadamente, en los cuales se incluyen aquellos utilizados para promover el crecimiento junto con el control y prevención de enfermedades en animales de consumo (**Dadgostar, 2019**). En el Ecuador, el empleo de antibióticos en la producción de pollos de engorde y bovinos de carne es una práctica que ha promovido la diseminación de bacterias multirresistentes productoras de BLEE (**Ortega-Paredes et al., 2020**). En el zoológico evaluado, la presencia de productos animales crudos destinados al consumo de los mamíferos del zoológico podría representar una vía de ingreso de microorganismos resistentes en la microbiota intestinal de los animales (**Economou & Gousia, 2015**). En estudios comparativos se ha demostrado que los aislamientos de ganado vacuno presentan bajos porcentajes de resistencia; mientras que, los aislados de pollos de engorde y cerdos muestran porcentajes altos con lo cual estos pueden actuar como reservorio de estas bacterias y como principal contribuyente de la transmisión de RAM (**Song et al., 2022**).

También hay que tomarse en consideración la presencia de *E. coli* productoras de BLEE en aislados de mamíferos con dieta omnívora y herbívora. Respecto a los vegetales y frutas destinadas al consumo en el zoológico, estos son adquiridos en el mercado Mayorista de la ciudad de Riobamba. Un estudio llevado a cabo en los mercados de la ciudad mostró que cepas de *E. coli* aisladas de vegetales frescos muestran multirresistencia (3 a 12 antibióticos); entre los vegetales analizados destacan la col blanca, lechuga, zanahoria, rábano, apio, pepinillo y tomate de carne, los cuales son usados en las dietas de los mamíferos del zoológico (**Barragán-Fonseca et al., 2022**). En el Ecuador, estudios enfocados en aguas de riego y su papel en la presencia de RAM en vegetales y frutas de 17 diferentes provincias mostró que, en verduras como la lechuga, col, espinaca, tomate de carne, fresas, melón, manzanas, bananas y sandías, existía la presencia de *E. coli* productora de BLEEs y que estas cepas eran resistentes a ampicilina y cefazolina, cefotaxima, tetraciclina y cefepime (**Montero et al., 2021**).

En general, los resultados más destacables son los aislados de ocelotes (*L. pardalis*), los cuales tomando en consideración la dieta y el tratamiento con antibióticos previos muestra una gran diversidad clonal de los aislados de este felino.

3. 2. Verificación de la hipótesis

Hipótesis nula rechazada.

Los mamíferos en cautiverio del EcoZoológico “San Martín” representan potenciales reservorios de aislamientos de *E. coli* multirresistente a antibióticos. De las 90 cepas aisladas, 32 (35.56%) mostraron resistencia a más de tres familias de antibióticos.

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4. 1. Conclusiones

- Se identificaron 90 aislamientos de *E. coli* obtenidas a partir de muestras fecales de los mamíferos del EcoZoológico “San Martín” – Baños de Agua Santa. El aislamiento selectivo y diferencial para esta bacteria (Agar Levine) fue confirmado por medio de la aplicación de pruebas bioquímicas (Lactosa, TSI, LIA, citrato, catalasa, ureasa e indol) y tinción Gram.
- Se caracterizó los perfiles de resistencia antimicrobiana de los aislamientos de *E. coli*, mostrando que 30 de los 90 aislados de *E. coli* (33.33%) poseen susceptibilidad y susceptibilidad intermedia a los antibióticos utilizados; mientras que 60 aislados (66.67%) presentan resistencia al menos un antibiótico, destaca la frecuente detección de microorganismos resistentes a antibióticos carbapenémicos y β -lactámicos, cuya diseminación representaría un potencial problema sanitario.
- Se destaca la presencia de 35.56% de aislados resistentes a más de 3 familias de antibióticos, con lo cual se acepta la hipótesis alternativa de este estudio, ya que los mamíferos en cautiverio del zoológico pueden ser usados como indicadores de resistencia antimicrobiana en el ambiente; además, de ser especies en donde es necesario enfocar los estudios de resistencia antimicrobiana en el Ecuador con el fin de controlar y prevenir el avance de este fenómeno. De la misma forma, estos hallazgos enfatizan la importancia de revisar las prácticas higiénicas y de sanitización de los hábitats de los zoológicos con la finalidad de reducir los riesgos zoonóticos asociados.
- Tras evaluar los perfiles fenotípicos de resistencia antimicrobiana de los aislamientos de *E. coli* mediante la técnica de Kirby y Bauer se observó que las cepas aisladas en medio EMB-CRO mostraban resistencia a más de 3 antibióticos; mientras que las cepas aisladas en medio EMB mostraban tener susceptibilidad y susceptibilidad intermedia a los antibióticos estudiados. Dentro de los perfiles fenotípicos se identifica la clasificación de las bacterias en 7 clústeres, siendo el clúster C1 y el clúster C7 aquellos que contienen aislados multirresistentes. En el

caso del clúster C1 el aislado E57 proveniente de ocelotes (*L. pardalis*) hábitat 19 presenta resistencia a los β -lactámicos combinados (AMC y TZP), penicilinas (AM), aminoglucósidos (AK y CN), antagonistas de la vía del folato (SXT) y quinolonas (CIP); por otro lado, en el clúster C7 el aislado E75 proveniente ocelotes (*L. pardalis*) hábitat 20 mostró resistencia al β -lactámico combinado TPZ, penicilinas (AM), cefalosporinas (FEP, CAZ, CRO y CXM), aminoglucósidos (CN), antagonistas de la vía del folato (SXT) y quinolonas (CIP).

- Tras un análisis de la información clínica y nutricional disponible de las diferentes especies de mamíferos estudiados se observó que aquellos aislados provenientes de animales con dieta carnívora y que habían recibido con anterioridad tratamiento con antibióticos presentaban perfiles de resistencia más destacables; en el caso de los felinos ocelotes (*L. pardalis*), sus aislados mostraban una diversidad clonal variada, de los tres hábitats que albergan a 5 ocelotes, en el hábitat 17 y 20 se encontraban 3 ocelotes que recibieron ampicilina/sulbactam, ampicilina y tobramicina dentro de sus tratamientos y en el hábitat 19, dos ocelotes que nunca recibieron tratamiento con antibióticos. Por otro lado, de los jaguares (*P. onca*) solo uno de sus aislados mostró multiresistencia, a pesar de, nunca haber recibido tratamiento con antibióticos. Estos felinos tienen en común la dieta que comparten, dentro de la cual se encuentran pollos, carne, vísceras y cuyes, que de acuerdo con otras investigaciones son reservorios de *E. coli* resistente.

4. 2. Recomendaciones

- Realizar una caracterización de *E. coli* en muestras de alimentos que forman parte de la dieta diaria de los animales estudiados con el fin de conocer si estos son un factor determinante de la presencia de *E. coli* multiresistente en mamíferos en cautiverio.
- Ampliar el estudio de resistencia antimicrobiana a las aves y reptiles presentes en el zoológico para conocer si existe presencia de *E. coli* u otras bacterias multiresistentes en otras especies del zoológico.
- Aislar *E. coli* de muestras de hisopado rectal en medios suplementados con antibióticos empleados en medicina veterinaria, como: enrofloxacina, amoxicilina,

ceftiofur o ácido fusídico para de esta forma incrementar el número de aislados obtenidos.

- Aumentar el número de antibióticos evaluados para conocer si los aislados obtenidos pueden poseer resistencia a un número más amplio de antibióticos empleados en medicina humana y veterinaria.
- Detectar genes que codifican betalactamasas de espectro extendido (BLEE), carbapenemasas (CPE) y genes de resistencia a colistina móvil (MCR) para conocer la distribución de genes de resistencia a antibióticos.

MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias Bibliográficas

- Abreu, R., Rodríguez-Álvarez, C., Castro-Hernandez, B., Lecuona-Fernández, M., González, J. C., Rodríguez-Novo, Y., & Arias Rodríguez, M. de los A. (2022). Prevalence and Characterisation of Multiresistant Bacterial Strains Isolated in Pigs from the Island of Tenerife. *Veterinary Sciences*, 9(6), 269. <https://doi.org/10.3390/VETSCI9060269>
- Aryal, S. (2018). *MacConkey Agar*. *Microbe Notes*. <https://microbenotes.com/macconkey-agar/>
- Azabo, R. R., Mshana, S. E., Matee, M. I., & Kimera, S. I. (2022). *Antimicrobial Resistance Pattern of Escherichia coli Isolates from Small Scale Dairy Cattle in Dar es Salaam , Tanzania*. 1–14.
- Babazadeh, D., & Ranjbar, R. (2021). (GTG)5-PCR Mediated Molecular Typing of Zoonotic Bacteria. *World's Veterinary Journal*, 11(2). <https://doi.org/10.54203/scil.2021.wvj37>
- Bakhshi, M., Zandi, H., Bafghi, M. F., Astani, A., Ranjbar, V. R., & Vakili, M. (2020). A survey for phylogenetic relationship; presence of virulence genes and antibiotic resistance patterns of avian pathogenic and uropathogenic *Escherichia coli* isolated from poultry and humans in Yazd, Iran. *Gene Reports*, 20. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100725>
- Baros Jorquera, C., Moreno-Switt, A. I., Sallaberry-Pincheira, N., Munita, J. M., Flores Navarro, C., Tardone, R., González-Rocha, G., Singer, R. S., & Bueno, I. (2021). Antimicrobial resistance in wildlife and in the built environment in a wildlife rehabilitation center. *One Health*, 13, 100298. <https://doi.org/10.1016/J.ONEHLT.2021.100298>
- Barragán-Fonseca, G., Tubón, J., & Calero-Cáceres, W. (2022). Data on antibiogram and resistance genes of Enterobacterales isolated from fresh vegetables in Ecuador. *Data in Brief*, 42, 108249. <https://doi.org/10.1016/J.DIB.2022.108249>
- Bergspica, I., Kaprou, G., Alexa, E. A., Prieto, M., & Alvarez-Ordóñez, A. (2020).

- Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) Producing *Escherichia coli* in Pigs and Pork Meat in the European Union. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(10), 1–23. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9100678>
- Berthe, T., Ratajczak, M., Clermont, O., Denamur, E., & Petit, F. (2013). Evidence for coexistence of distinct *Escherichia coli* populations in various aquatic environments and their survival in estuary water. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(15), 4684–4693. <https://doi.org/10.1128/AEM.00698-13>
- Bourély, C., Cazeau, G., Jarrige, N., Jouy, E., Haenni, M., Lupo, A., Madec, J. Y., Leblond, A., & Gay, E. (2019). Co-resistance to Amoxicillin and Tetracycline as an Indicator of Multidrug Resistance in *Escherichia coli* Isolates From Animals. *Frontiers in Microbiology*, 10(October), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02288>
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2020). Epidemiology of β -lactamase-producing pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(2). <https://doi.org/10.1128/CMR.00047-19/ASSET/4FE61FD8-42AC-47DE-894C-0D8BEAF8F74A/ASSETS/GRAPHIC/CMR.00047-19-F0007.JPEG>
- CDC. (2021). *How Antibiotic Resistance Happens*. Centers for Disease Control and Prevention. [shorturl.at/DLUW5](https://www.cdc.gov/antibiotic-resistance/shorturl.at/DLUW5)
- CDC. (2022, June 9). *One Health*. Centers for Disease Control and Prevention , National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID). <https://www.cdc.gov/onehealth/index.html>
- Christaki, E., Marcou, M., & Tofarides, A. (2020). Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *Journal of Molecular Evolution*, 88(1), 26–40. <https://doi.org/10.1007/S00239-019-09914-3>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2021). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. In *Journal of Services Marketing* (31st ed., Vol. 8, Issue 3). Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).
- Cristóbal-Azkarate, J., Dunn, J. C., Day, J. M. W., & Amáñile-Cuevas, C. F. (2014). Resistance to antibiotics of clinical relevance in the fecal microbiota of Mexican wildlife. *PLoS ONE*, 9(9), 3–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107719>
- Cui, X., Zhang, H., & Du, H. (2019). Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Detection and Antimicrobial Therapy. *Frontiers in Microbiology*, 0, 1823. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01823>

- Dadgostar, P. (2019). Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *Infection and Drug Resistance*, 12, 3903. <https://doi.org/10.2147/IDR.S234610>
- Dantas-Palmeira, J., & Neto-Ferreira, H. M. (2020). Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in cattle production – a threat around the world. *Heliyon*, 6(1). <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2020.E03206>
- De Witte, C., Vereecke, N., Theuns, S., De Ruyck, C., Vercammen, F., Bouts, T., Boyen, F., Nauwynck, H., & Haesebrouck, F. (2021). Presence of Broad-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in Zoo Mammals. *Microorganisms*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9040834>
- Dolejska, M. (2020). Antibiotic-Resistant Bacteria in Wildlife. *Handbook of Environmental Chemistry*, 91, 19–70. https://doi.org/10.1007/698_2020_467
- Economou, V., & Gousia, P. (2015). Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infection and Drug Resistance*, 8, 49–61. <https://doi.org/10.2147/IDR.S55778>
- Egorov, A. M., Ulyashova, M. M., & Rubtsova, M. Y. (2020). Inhibitors of β -Lactamases. New Life of β -Lactam Antibiotics. *Biochemistry (Moscow)*, 85(11), 1292–1309. <https://doi.org/10.1134/S0006297920110024>
- Fuentes-Castillo, D., Navas-Suárez, P. E., Gondim, M. F., Esposito, F., Sacristán, C., Fontana, H., Fuga, B., Piovani, C., Kooij, R., Lincopan, N., & Catão-Dias, J. L. (2021). Genomic characterization of multidrug-resistant ESBL-producing *Escherichia coli* ST58 causing fatal colibacillosis in critically endangered Brazilian merganser (*Mergus octosetaceus*). *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(2), 258–266. <https://doi.org/10.1111/TBED.13686>
- Furness, L. E., Campbell, A., Zhang, L., Gaze, W. H., & McDonald, R. A. (2017). Wild small mammals as sentinels for the environmental transmission of antimicrobial resistance. *Environmental Research*, 154, 28–34. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2016.12.014>
- Galindo-Méndez, M. (2020). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. In *E. coli Infection*. IntechOpen.
- González-Barrio, D. (2022). Zoonoses and Wildlife: One Health Approach. *Animals*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/ani12040480>
- Gopee, N. V., Adesiyun, A. A., & Caesar, K. (2000). A Longitudinal Study of

- Escherichia coli* Strains Isolated From Captive Mammals, Birds, And Reptiles In Trinidad. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 31(3), 353–360. [https://doi.org/https://doi.org/10.1638/1042-7260\(2000\)031\[0353:ALSOEC\]2.0.CO;2](https://doi.org/https://doi.org/10.1638/1042-7260(2000)031[0353:ALSOEC]2.0.CO;2)
- Haro-León, N., Koch-Kaiser, A., Carillo-Bilbao, G., & Martin-Solano, S. (2020). Resistencia Antimicrobiana en Aislados Fecales de *Escherichia coli* Procedentes de *Cebus yuracus* en Napo-Ecuador. *ECUADOR ES CALIDAD*, 7(1), 1. <https://doi.org/10.36331/revista.v7i1.84>
- Howe, E., Holton, K., Nair, S., Schlauch, D., Sinha, R., & Quackenbush, J. (2010). MeV: MultiExperiment Viewer. In M. F. Ochs, J. T. Casagrande, & R. V. Davuluri (Eds.), *Biomedical Informatics for Cancer Research* (pp. 267–278). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5714-6>
- Hudzicki, J. (2009). *Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol*.
- IACG. (2019). *No podemos esperar: Asegurar el futuro contra las infecciones farmacorresistentes*.
- Ishihara, K., Hosokawa, Y., Makita, K., Noda, J., Ueno, H., Muramatsu, Y., Ueno, H., Mukai, T., Yamamoto, H., Ito, M., & Tamura, Y. (2012). Factors associated with antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in zoo animals. *Research in Veterinary Science*, 93(2), 574–580. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.09.006>
- Jardine, C. M., Janecko, N., Allan, M., Boerlin, P., Chalmers, G., Kozak, G., McEwen, S. A., & Reid-Smith, R. J. (2012). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Raccoons (*Procyon lotor*) in Southern Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(11), 3873. <https://doi.org/10.1128/AEM.00705-12>
- Kaboré, B., Ouédraogo, G. A., Cissé, H., Ouédraogo, H. S., Sampo, E., Zongo, K. J., Zeba, B., Traoré, Y., Gnankiné, O., Sanou, I., & Savadogo, A. (2022). (GTG)5-PCR fingerprinting of multi-drug resistant *Escherichia coli* bacteria isolates from hospital in Ouagadougou, Burkina Faso. *BMC Microbiology*, 22(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/S12866-022-02537-7/FIGURES/4>
- Köck, R., Herr, C., Kreienbrock, L., Schwarz, S., Tenhagen, B. A., & Walther, B. (2021). Multiresistant Gram-Negative Pathogens: A Zoonotic Problem. *Deutsches Ärzteblatt International*, 118(35–36), 579. <https://doi.org/10.3238/ARZTEBL.M2021.0184>

- Krusei, C. (2021). *CHROMagar TM mSuperCARBA. For detection and isolation of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE)*.
- Lagha, R., Ben Abdallah, F., ALKhamash, A. A. H., Amor, N., Hassan, M. M., Mabrouk, I., Alhomrani, M., & Gaber, A. (2021). Molecular characterization of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates recovered from King Abdulaziz Specialist Hospital at Taif City, Saudi Arabia. *Journal of Infection and Public Health*, *14*(1). <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.12.001>
- Literak, I., Dolejska, M., Radimersky, T., Klimes, J., Friedman, M., Aarestrup, F. M., Hasman, H., & Cizek, A. (2010). Antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: Multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars. *Journal of Applied Microbiology*, *108*(5), 1702–1711. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04572.x>
- MacDougall, C. (2018). Penicillins, Cephalosporins, and Other β -Lactam Antibiotics. In L. L. Brunton, R. Hilal-Dandan, & B. Knollmann (Eds.), *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (13th ed.). McGraw-Hill Education. <https://doi.org/10.4324/9780203813034>
- MacFaddin, J. F. (2004). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica* (3rd ed.). Médica Panamericana.
- MacGowan, A., & Macnaughton, E. (2017). Antibiotic resistance. *Medicine (United Kingdom)*, *45*(10), 622–628. <https://doi.org/10.1016/J.MPMED.2017.07.006>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). Microbiología Diagnóstica. In *Biología de los microorganismos* (14th ed., pp. 869–897). Pearson.
- Medina, C. G., Morales, S. C., & Navarrete, M. Z. (2017). Resistencia Antibiótica de Enterobacterias Aisladas de Monos (*Ateles*, *Callicebus* y *Lagothrix*) en Semicautiverio en un Centro de Rescate, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, *28*(2), 418–425. <https://doi.org/10.15381/RIVEP.V28.I2.13073>
- Merck. (2008). LEVINE EMB Agar (Eosin Methylene-blue Lactose Agar acc . In *Merck Microbiology Manual* (12th ed., pp. 325–326). Merck.
- Michael, C. A., Dominey-Howes, D., & Labbate, M. (2014). The antimicrobial resistance crisis: Causes, consequences, and management. *Frontiers in Public*

- Health*, 2(SEP), 145. <https://doi.org/10.3389/FPUBH.2014.00145/BIBTEX>
- Mills, J. P., & Marchaim, D. (2021). Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria: Infection Prevention and Control Update. *Infectious Disease Clinics of North America*, 35(4), 969–994. <https://doi.org/10.1016/J.IDC.2021.08.001>
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2019). *Resistencia antimicrobiana en Ecuador 2014-2018*.
- Mohapatra, B. R., Broersma, K., & Mazumder, A. (2007). Comparison of five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds. *FEMS Microbiology Letters*, 277(1), 98–106. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00948.x>
- Montero, L., Irazabal, J., Cardenas, P., Graham, J. P., & Trueba, G. (2021). Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing-*Escherichia coli* Isolated From Irrigation Waters and Produce in Ecuador. *Frontiers in Microbiology*, 12, 2966. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.709418/BIBTEX>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., & Pfaller, M. A. (2007). *Manual of Clinical Microbiology* (9th ed.). ASM Press.
- Naylor, N. R., Atun, R., Zhu, N., Kulasabanathan, K., Silva, S., Chatterjee, A., Knight, G. M., & Robotham, J. V. (2018). Estimating the burden of antimicrobial resistance: a systematic literature review. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* 2018 7:1, 7(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/S13756-018-0336-Y>
- Oliva-Martínez, M. M., & Baéz-Gómez, A. L. (2019). Epidemia silente del siglo XXI. Resistencia microbiana a los antibióticos. *Revista Electrónica Medimay*, 26(2).
- Oliveira, J., & Reygaert, W. C. (2021). *Gram Negative Bacteria*. StatPearls Publishing LLC.

- Ortega-Paredes, D., de Janon, S., Villavicencio, F., Ruales, K. J., De La Torre, K., Villacís, J. E., Wagenaar, J. A., Matheu, J., Bravo-Vallejo, C., Fernández-Moreira, E., & Vinuesa-Burgos, C. (2020). Broiler Farms and Carcasses Are an Important Reservoir of Multi-Drug Resistant *Escherichia coli* in Ecuador. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 979. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2020.547843/BIBTEX>
- Pandey, N., & Cascella, M. (2022). Beta Lactam Antibiotics. *Antibiotic Discovery and Development*, 79–117. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1400-1_3
- Papalexandratou, Z., Cleenwerck, I., De Vos, P., & De Vuyst, L. (2009). (GTG)5-PCR reference framework for acetic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 301(1). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01792.x>
- Plaza-Rodríguez, C., Alt, K., Grobbel, M., Hammerl, J. A., Irrgang, A., Szabo, I., Stingl, K., Schuh, E., Wiehle, L., Pfefferkorn, B., Naumann, S., Kaesbohrer, A., & Tenhagen, B. A. (2021). Wildlife as Sentinels of Antimicrobial Resistance in Germany? *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 1251. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2020.627821/BIBTEX>
- Poirel, L., Madec, J.-Y., Lupo, A., Schink, A.-K., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, S. (2018). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017>
- Ramey, A. M., & Ahlstrom, C. A. (2020). Antibiotic resistant bacteria in wildlife: perspectives on trends, acquisition and dissemination, data gaps, and future directions. *Journal of Wildlife Diseases*, 56(1), 1–15. <https://doi.org/10.7589/2019-04-099>
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- Sánchez-Salazar, E., Gudiño, M. E., Sevillano, G., Zurita, J., Guerrero-López, R., Jaramillo, K., & Calero-Cáceres, W. (2019). Antibiotic resistance of *Salmonella* strains from layer poultry farms in central Ecuador. *Journal of Applied Microbiology*, 1–8. <https://doi.org/10.1111/jam.14562>
- Sengupta, S., Chattopadhyay, M. K., & Grossart, H. P. (2013). The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Frontiers in Microbiology*, 4(MAR), 47. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2013.00047/BIBTEX>

- Shnaiderman-Torban, A., Steinman, A., Meidan, G., Paitan, Y., Ahmad, W. A., & Navon-Venezia, S. (2019). Petting zoo animals as an emerging reservoir of extended-spectrum β -lactamase and AmpC-producing *Enterobacteriaceae*. *Frontiers in Microbiology*, *10*(OCT), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02488>
- Song, H. J., Kim, S. J., Moon, D. C., Mechesso, A. F., Choi, J. H., Kang, H. Y., Bobby, N., Yoon, S. S., & Lim, S. K. (2022). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Healthy Food Animals in South Korea, 2010–2020. *Microorganisms*, *10*(3). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10030524>
- Swift, B. M. C., Bennett, M., Waller, K., Dodd, C., Murray, A., Gomes, R. L., Humphreys, B., Hobman, J. L., Jones, M. A., Whitlock, S. E., Mitchell, L. J., Lennon, R. J., & Arnold, K. E. (2019). Anthropogenic environmental drivers of antimicrobial resistance in wildlife. *The Science of the Total Environment*, *649*, 12–20. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.08.180>
- Sykes, J. E., & Papich, M. G. (2014). Antibacterial Drugs. In *Canine and Feline Infectious Diseases* (pp. 66–86). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0795-3.00008-9>
- Tadesse, D. A., Zhao, S., Tong, E., Ayers, S., Singh, A., Bartholomew, M. J., & McDermott, P. F. (2012). Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950–2002. In *Emerging Infectious Diseases* (Vol. 18, Issue 5, pp. 741–749). Centers for Disease Control and Prevention. <https://doi.org/10.3201/eid1805.111153>
- Tinoco-Torres, R., Fernandes, J., Carvalho, J., Cunha, M. V., Caetano, T., Mendo, S., Serrano, E., & Fonseca, C. (2020). Wild boar as a reservoir of antimicrobial resistance. *The Science of the Total Environment*, *717*. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.135001>
- Tripathi, N., & Sapra, A. (2021). Gram Staining. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/>
- Vargas, J., Máttar, S., & Monsalve, S. (2010). Bacterias patógenas con alta resistencia a antibióticos: estudio sobre reservorios bacterianos en animales cautivos en el zoológico de Barranquilla. *Infectio*, *14*(1), 6–19. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(10\)70088-6](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(10)70088-6)

- Wang, Y., He, T., Han, J., Wang, J., Foley, S. L., Yang, G., Wan, S., Shen, J., & Wu, C. (2012). Prevalence of ESBLs and PMQR genes in fecal *Escherichia coli* isolated from the non-human primates in six zoos in China. *Veterinary Microbiology*, *159*(1–2), 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.03.009>
- Wax, R. G., Lewis, K., Salyers, A. A., & Taber, H. (2007). *Bacterial resistance to antimicrobials* (second). CRC Press.
- WHO. (2017a). *Critically Important Antimicrobials for Human Medicine 5th Revision 2016 Ranking of medically important antimicrobials for risk management of antimicrobial resistance due to non-human use*.
- WHO. (2017b). *WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed*. World Health Organization. Media Centre. . <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>
- WHO, FAO, OIE, & UNEP. (2022). *Strategic Framework for collaboration on antimicrobial resistance*.
- Zanardi, G., Iemmi, T., Spadini, C., Taddei, S., Cavarani, S., & Cabassi, C. S. (2020). Wild Micromammals as Bioindicators of Antibiotic Resistance in Ecopathology in Northern Italy. *Animals*, *10*(7), 1184. <https://doi.org/10.3390/ANI10071184>

Anexos

Anexo 1.

Dieta de los mamíferos del EcoZoológico "San Martín"

Código	Mamíferos de EcoZoológico "San Martín"		Dieta diaria	
	Nombre común	Nombre científico	lunes/miércoles/viernes/domingo	martes/jueves/sábado
C1-AD	Ardilla	<i>Sciurus vulgaris</i>	Una mezcla de las frutas y vegetales destinadas a las dietas de los otros mamíferos	
E4-CCB	Mono capuchino cara blanca	<i>Cebus capucinus</i>	Banana pacífico (plátano), apio completo, papaya/melón, pepinillo pelado,	Banano pacífico (plátano), tomate de árbol, sandía, manzana/pera, maracuyá/taxo,
	Mono cotoncillo rojo	<i>Callicebus discolor</i>	tomate/taxo, piña/mango/durazno, zanahoria, vainita, huevo entero sin cáscara	guayaba, mora/fresa, coliflor/brócoli, concentrado de perro, acelga
M10-CS	Cusumbo	<i>Potos flavus</i>	Banano/plátano, uva/uvilla, papaya/babaco,	Banano/plátano, lechuga/col, balanceado
			huevo cocido sin pelar, zanahoria, ratón/pescado, pepinillo, sandía, apio, piña/mango/durazno/pepino dulce	de perro, mango/pepino, sandía/melón, guayaba, coliflor/brócoli, pollo crudo, tomate de árbol, manzana/pera
E3-GV	Guatusa negra	<i>Dasyprocta fuliginosa</i>	Plátano, naranja, pepinillo sin cáscara, zanahoria, yuca, apio/nabo, tomate, maíz tierno/choclo, concentrado de cuy	Plátano rechazo, guayaba, zapallo/zambo, coliflor/brócoli, acelga/espinaca, manzana/pera, maíz tierno/choclo, papa china, concentrado de cuy

Código	Mamíferos de EcoZoológico "San Martín"		Dieta diaria	
	Nombre común	Nombre científico	lunes/miércoles/viernes/domingo	martes/jueves/sábado
	Venado rojizo enano	<i>Mazama rufina</i>	Banano/plátano, papaya/melón, remolacha, nabo, espinaca, zapallo, concentrado de equinos, pepinillo, lechuga, apio	Banano/plátano, zanahoria, coliflor/brócoli, concentrado de equinos, acelga, zambo, alfalfa, col, melón/sandía, papa nabo
M18-GN	Guatusa negra	<i>Dasyprocta fuliginosa</i>	Banano/plátano, nabo, zanahoria, yuca blanca, aguacate, zapallo/zambo, coliflor	Plátano (rechazo), zanahoria, zambo/zapallo, papa china, nabo, naranja, brócoli
M5-JG	Jaguar	<i>Panthera onca</i>	Carne con hueso de res, carne con hueso de pollo, corazón de res, presa viva entera (en el caso de aves se elimina la cabeza y patas)	Carne con hueso de res, carne con hueso de pollo, corazón e hígado de res
M8-MP	Mapache	<i>Procyon cancrivorus</i>	Banano/plátano, granadilla/taxo, piña/mango/durazno/pepino dulce, tomate de riñón, huevo cocido sin pelar, ratón juvenil/pollo, pepinillo pelado, papaya/babaco, espinaca, zanahoria	Banano/plátano, mango/pepino, melón/sandía, guayaba, pescado/camarón, coliflor/brócoli, concentrado de perros, mora/fresa, manzana/pera, lechuga
M3-MA	Mono araña	<i>Ateles belzebuth</i>	Banano (plátano), espinaca, huevo/pollo, pepinillo pelado, tomate de riñón, apio,	Banano (plátano), acelga, tomate de árbol, aguacate/coco, guayaba, lechuga,
M15-MA	Mono araña	<i>Ateles belzebuth</i>	maní/girasol, naranja, maracuyá/taxo, zanahoria, melón/papaya, caña	papaya/melón, balanceado de perro/grillos, manzana, coliflor/brócoli, sandía, fresa/mora

Código	Mamíferos de EcoZoológico "San Martín"		Dieta diaria	
	Nombre común	Nombre científico	lunes/miércoles/viernes/domingo	martes/jueves/sábado
M13-MACM	Mono araña cabeza marrón	<i>Ateles fusciceps</i>	Mandarina/naranja, papaya/melón, coliflor, huevo cocido sin cáscara, piña/durazno/mango, nabo, uva negra/uvilla, concentrado de perro, peinillo pelado, banano/plátano	Maracuyá, melón/sandía, brócoli, manzana/pera, pepino dulce, acelga, banano/plátano, lenteja, lechuga, tomate de árbol
M1-MNA	Mono ardilla	<i>Saimiri cassiquiarensis</i>	Banano (plátano), pepinillo pelado, espinaca, mango/pepino dulce, huevo sin cáscara, vainita/maní/girasol, melón/babaco, maracuyá/taxo, tomate de riñón, apio, zanahoria, caña	Banano (plátano), sandía, acelga, coco/aguacate, coliflor/brócoli, guayaba, concentrado de perro, manzana/pera, papaya/melón, lechuga, naranja, fresa/mora
E5-MM	Mono capuchino	<i>Cebus yaracus</i>	Plátano con cascara, taxo/maracuyá, espinaca, melón, sandía pelada, huevo con cáscara, pepinillo pelado, apio con tallo, brócoli, uva/uvilla, hígado	Plátano con cáscara, acelga con tallos, pollo, papaya, manzana, moras/fresas, concentrado de perros, vainita, lechuga, pepino dulce/piña, guayaba
E5-MM	Mono maicero	<i>Sapajus apella</i>	Banano/plátano, melón/papaya, coliflor, tomate, piña/durazno/mango, nabo, uvilla, huevo sin cáscara, lechuga, tamarindo/taxo	Banana común, manzana/pera, brócoli, tomate de árbol, pepino dulce/mango, acelga, papaya/sandía, maracuyá, concentrado de perros, mora/fresa
M16-MC	Mono capuchino blanco de occidente	<i>Cebus albifrons aequatorialis</i>	Banano/plátano, melon/babaco, pepinillo sin cáscara, zanahoria, pepino dulce, huevo con cáscara, tomaqte, piña	Banano/plátano, sandía, acelga, coco/aguacate, coliflor/brócoli, guayaba, lechuga, manzana, pera, papaya/melón,

Código	Mamíferos de EcoZoológico "San Martín"		Dieta diaria	
	Nombre común	Nombre científico	lunes/miércoles/viernes/domingo	martes/jueves/sábado
			pelada/mango/durazno, apio (tallos), aguacate/espinaca, ratón juvenil	maíz tierno/choclo, tomate de árbol, lenteja, maracuyá/taxo
M7-MCH	Mono chorongo	<i>Lagothrix lagotricha</i>	Banano (plátano), piña, pepinillo pelado, tomate de riñón, mango/pepino dulce, papaya/melón, zanahoria, brócoli/coliflor, apio completo, vainita, huevo, espinaca	Banano (plátano), manzana, guayaba, sandía, concentrado de perro, naranja, aguacate/coco, lechuga, coliflor/brócoli, acelga, berenjena, fresa/mora
M11-MN	Mono nocturno	<i>Aotus vociferans</i>	Plátano con cascara, taxo/maracuyá, espinaca, melón, sandía pelada, huevo con cáscara, pepinillo pelado, apio con tallo, brócoli, uva/uvilla, hígado	Plátano con cáscara, acelga con tallos, pollo, papaya, manzana, moras/fresas, concentrado de perros, vainita, lechuga, pepino dulce/piña, guayaba
M17-OC	Ocelotes	<i>Leopardus pardalis</i>		
M19-OC	Ocelotes	<i>Leopardus pardalis</i>	Carne con hueso de res, carne con hueso de pollo, corazón de res, presa viva entera (en el caso de aves se elimina la cabeza y patas)	Carne con hueso de res, carne con hueso de pollo, corazón e hígado de res
M20-OC	Ocelotes	<i>Leopardus pardalis</i>		
M12-OA	Oso de anteojos	<i>Tremarctos ornatus</i>	Banano/Plátano, sandía, concentrado de perro, maracuyá/taxo, papaya/babaco, pescado, pepinillo con cáscara, choclo/maíz	Banano/plátano, sandía, concentrado de perro, choclo/maíz, manzana/pera, melón/papaya, espinaca, melaza

Código	Mamíferos de EcoZoológico "San Martín"		Dieta diaria	
	Nombre común	Nombre científico	lunes/miércoles/viernes/domingo	martes/jueves/sábado
M4-PC	Pecarí de Collar	<i>Dicotyles tajacu</i>	Una mezcla de los alimentos destinados a otros mamíferos junto balanceado	
M6-PM	Puma	<i>Puma concolor</i>	Carne con hueso de res, carne con hueso de pollo, corazón de res, presa viva entera (en el caso de aves se elimina la cabeza y patas)	Carne con hueso de res, carne con hueso de pollo, corazón e hígado de res
M9-TA	Taira	<i>Eira barbara</i>	Banano/plátano, papaya/babaco, tomate de riñón, taxo/maracuyá, tallos de apio, ratón/pollo, coco/maní/aguacate, sandía, uva/uvilla, huevo cocido pelado	Banano/plátano, melón/sandía, pera/manzana, guayaba, fresa/mora, mango/pepino, pescado/camarón, tomate de árbol, maíz/choclo, concentrado de perro
E2-TP	Tapir amazónico	<i>Tapirus terrestris</i>	Banano/plátano, papaya/melón, remolacha, nabo, espinaca, zapallo, concentrado de equinos, pepinillo, lechuga, apio	Banano/plátano, zanahoria, coliflor/brócoli, concentrado de equinos, acelga, zambo, alfalfa, col, melón/sandía, papa nabo
A2-TP	Tapir amazónico	<i>Tapirus terrestris</i>		
E1-TB	Tigre de Bengala Blanco	<i>Panthera tigris tigris</i>	Carne con hueso de res (trozos medianos, costillas enteras), carne con hueso de pollo (la parte de la pierna debe ser eliminada y estar sin piel), corazón de res, presa viva entera (en el caso de aves se elimina la cabeza y patas)	Carne con hueso de res (trozos medianos, costillas enteras), carne con hueso de pollo (la parte de la pierna debe ser eliminada y estar sin piel), corazón e hígado de res

Código	Mamíferos de EcoZoológico "San Martín"		Dieta diaria	
	Nombre común	Nombre científico	lunes/miércoles/viernes/domingo	martes/jueves/sábado
M2-VCB	Venado de cola blanca	<i>Odocoileus virginianus peruvianus</i>	Banano/plátano, zanahoria, nabo, coliflor, rábano, yuca/papa china, avena (hojuelas), lechuga, papaya/melón, pepinillo con cáscara, zapallo, apio completo, concentrado de equino	Banano/plátano, col, sandía, brócoli, zucchini/zambo, acelga, papa china/yuca, zanahoria, papa nabo, manzana/pera, alfalfa, berenjena, concentrado de equino
M14-VRE	Venado rojizo enano	<i>Mazama rufina</i>	Banano/plátano, papaya/melón, remolacha, nabo, espinaca, zapallo, concentrado de equinos, pepinillo, lechuga, apio	Banano/plátano, zanahoria, coliflor/brócoli, concentrado de equinos, acelga, zambo, alfalfa, col, melón/sandía, papa nabo

Anexo 2.

Aislados de *E. coli fecal* criopreservados

Código	Mamíferos de EcoZoológico "San Martín"		<i>E. coli fecal</i> aislada en medio	
	Nombre común	Nombre científico	EMB	EMB – CRO
C1-AD	Ardilla	<i>Sciurus vulgaris</i>	ZCD1	-
E4-CCB	Mono capuchino cara blanca	<i>Cebus capucinus</i>	ZCCB1	ZCCB-1
	Mono cotoncillo rojo	<i>Callicebus discolor</i>	ZCCB2	ZCCB-2

Código	Mamíferos de EcoZoológico "San Martín"		<i>E. coli fecal</i> aislada en medio	
	Nombre común	Nombre científico	EMB	EMB – CRO
				ZCCB-3
				ZCCB-4
M10-CS	Cusumbo	<i>Potos flavus</i>	ZM10CS1	-
			ZM10CS2	
E3-GV	Guatusa negra	<i>Dasyprocta fuliginosa</i>	ZGV1	-
	Venado rojizo enano	<i>Mazama rufina</i>	ZGV2	
M18-GN	Guatusa negra	<i>Dasyprocta fuliginosa</i>	ZGN1	-
			ZGN2	
				ZJG-1
M5-JG	Jaguar	<i>Panthera onca</i>	ZJG1	ZJG-2
			ZJG2	ZJG-3
				ZJG-4
				ZMP-1
M8-MP	Mapache	<i>Procyon cancrivorus</i>	ZM8MP1	ZMP-2
			ZM8MP2	ZMP-3
M3-MA	Mono araña	<i>Ateles belzebuth</i>	ZMA1	-
			ZMA2	
M15-MA	Mono araña	<i>Ateles belzebuth</i>	Z15MA1	-
			Z15MA2	
M13-MACM	Mono araña cabeza marrón	<i>Ateles fusciceps</i>	ZMACM1	-
			ZMACM2	

Código	Mamíferos de EcoZoológico "San Martín"		<i>E. coli fecal</i> aislada en medio	
	Nombre común	Nombre científico	EMB	EMB – CRO
M1-MNA	Mono ardilla	<i>Saimiri cassiquiarensis</i>	ZMNA1	
	Mono nocturno	<i>Aotus vociferans</i>	ZMNA2	-
E5-MM	Mono capuchino	<i>Cebus yaracus</i>	ZMM1	
	Mono maicero	<i>Sapajus apella</i>	ZMM2	-
M16-MC	Mono capuchino blanco de occidente	<i>Cebus albifrons aequatorialis</i>		ZMC-1
				ZMC-2
			ZM16MC1	ZMC-3
			ZM16MC2	ZMC-4
				ZMC-5
M7-MCH	Mono chorongo	<i>Lagothrix lagotricha</i>	ZMCH1	ZMCH2
			ZMCH3	
M11-MN	Mono nocturno	<i>Aotus vociferans</i>	ZMN1	-
			ZMN2	
M17-OC	Ocelotes	<i>Leopardus pardalis</i>	Z17OC1	Z17OC-2
			Z17OC2	Z17OC-3
				Z17OC-4
				Z19OC-1
M19-OC	Ocelotes	<i>Leopardus pardalis</i>	Z19OC1	Z19OC-2
			Z19OC2	Z19OC-3
				Z19OC-4

Código	Mamíferos de EcoZoológico "San Martín"		<i>E. coli fecal</i> aislada en medio	
	Nombre común	Nombre científico	EMB	EMB – CRO
				Z20OC-1
M20-OC	Ocelotes	<i>Leopardus pardalis</i>	Z20OC1	Z20OC-2
			Z20OC2	Z20OC-3
				Z20OC-4
M12-OA	Oso de anteojos	<i>Tremarctos ornatus</i>	ZOA1	-
				ZM4PC-1
				ZM4PC-2
M4-PC	Pecarí de Collar	<i>Dicotyles tajacu</i>	ZM4PC1	ZM4PC-3
			ZM4PC2	ZM4PC-4
				ZM4PC-5
M6-PM	Puma	<i>Puma concolor</i>		ZPM1
			ZM9TA1	
M9-TA	Taira	<i>Eira barbara</i>	ZM9TA2	ZM9-TA1
			ZTP1	
E2-TP	Tapir amazónico	<i>Tapirus terrestris</i>	ZTP2	ZTP-1
			ZATP1	
A2-TP	Tapir amazónico	<i>Tapirus terrestris</i>	ZATP2	ZATP-1
			ZTB1	ZTB2
E1-TB	Tigre de Bengala Blanco	<i>Panthera tigris tigris</i>	ZTB3	ZTB4
			ZVCB1	
M2-VCB	Venado de cola blanca	<i>Odocoileus virginianus peruvianus</i>	ZVCB2	-

Código	Mamíferos de EcoZoológico "San Martín"		<i>E. coli fecal</i> aislada en medio	
	Nombre común	Nombre científico	EMB	EMB – CRO
M14-VRE	Venado rojizo enano	<i>Mazama rufina</i>	ZM14VRE1 ZM14VRE2	-

CRO: ceftriaxona. **Nota:** Se tuvo por objetivo recuperar 5 aislados de *E. coli* fecal resistente al antibiótico ceftriaxona (CRO) por cada hábitat muestreado, con el fin de registrar un total de 135 aislados de *E. coli* de los 27 hábitats. Por otro lado, para *E. coli* fecal recuperada en medio sin antibiótico se tuvo por objetivo obtener 2 aislados por cada hábitat, para registrarse un total de 54 aislados de *E. coli* fecal aislamiento en medio sin antibiótico.

Anexo 3.

Resultados pruebas de identificación de *E. coli*

Número de aislado	Código de criopreservación	Resultados pruebas bioquímicas y tinción GRAM para <i>E. coli</i>							
		MacConkey	TSI	Citrato	LIA	Catalasa	Indol	Ureasa	Tinción GRAM
E1	ZMCH1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E2	ZMCH2	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E3	ZMCH3	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E4	ZTB1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E5	ZTB2	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E6	ZTB3	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E7	ZTB4	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E8	ZPM1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E9	ZOA1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E10	ZMNA1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E11	ZMNA2	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo

Número de aislado	Código de criopreservación	<i>Resultados pruebas bioquímicas y tinción GRAM para E. coli</i>							
		MacConkey	TSI	Citrato	LIA	Catalasa	Indol	Ureasa	Tinción GRAM
E12	ZVCB1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E13	ZVCB2	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E14	ZMA1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E15	ZMA2	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E16	ZMACM1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E17	ZMACM2	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E18	ZM4PC1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E19	ZM4PC2	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E20	ZM8MP1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E21	ZM8MP2	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E22	ZM9TA1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E23	ZM9TA2	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E24	ZM10CS1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E25	ZM10CS2	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E26	ZM14VRE1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E27	ZM14VRE2	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E28	ZM16MC1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E29	ZM16MC2	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E30	ZM4-PC1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E31	ZM4-PC2	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E32	ZM9-TA1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E33	ZMP-1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E34	ZMP-2	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo

Número de aislado	Código de criopreservación	<i>Resultados pruebas bioquímicas y tinción GRAM para E. coli</i>							
		MacConkey	TSI	Citrato	LIA	Catalasa	Indol	Ureasa	Tinción GRAM
E35	ZMC-1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E36	ZMC-2	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E37	ZMC-3	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E38	ZMC-4	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E39	ZMC-5	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E40	ZGN1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E41	ZGN2	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E42	ZMN1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E43	ZMN2	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E44	ZM4-PC3	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E45	ZM4-PC4	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E46	ZM4-PC5	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E47	ZMP-3	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E48	ZCCB1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E49	ZCCB2	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E50	ZMM1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E51	ZMM2	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E52	ZJG1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E53	ZJG2	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E54	Z17OC1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E55	Z17OC2	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E56	Z19OC1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E57	Z19OC2	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo

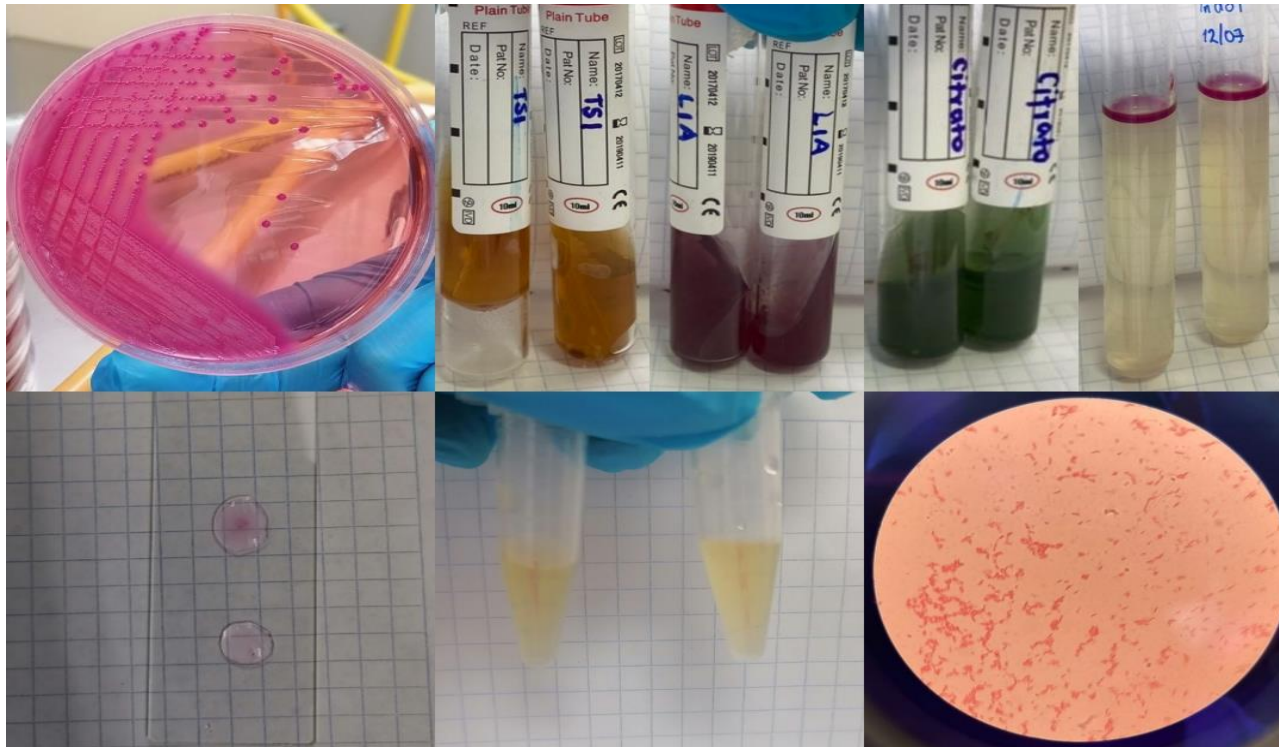
Número de aislado	Código de criopreservación	<i>Resultados pruebas bioquímicas y tinción GRAM para E. coli</i>							
		MacConkey	TSI	Citrato	LIA	Catalasa	Indol	Ureasa	Tinción GRAM
E58	Z20OC1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E59	Z20OC2	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E60	Z15MA1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E61	Z15MA2	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E62	Z17OC-1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E63	Z17OC-2	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E64	Z19OC-1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E65	Z20OC-2	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E66	Z20OC-3	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E67	ZCCB-1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E68	ZCCB-2	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E69	ZCCB-3	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E70	ZCCB-4	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E71	ZJG-1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E72	ZJG-2	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E73	ZJG-3	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E74	ZJG-4	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E75	Z20OC-1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E76	Z17OC-3	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E77	Z17OC-4	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E78	Z19OC-2	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E79	Z19OC-3	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E80	Z19OC-4	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo

Número de aislado	Código de criopreservación	<i>Resultados pruebas bioquímicas y tinción GRAM para E. coli</i>							
		MacConkey	TSI	Citrato	LIA	Catalasa	Indol	Ureasa	Tinción GRAM
E81	Z20OC-4	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E82	ZGV1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E83	ZGV2	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E84	ZCD1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E87	ZTP1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E88	ZTP2	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E89	ZATP1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E90	ZATP2	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E98	ZTP-1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo
E99	ZATP-1	Lac (+)	A/A H ₂ S-	-	K/K H ₂ S-	+	+	-	Bacilos color rojo

MacConkey: Lac (+) , positivo para el consumo del lactosa; **TSI:** A/A H₂S- (producción de ácido sin producción de sulfuros y liberación de CO₂); **Citrato:** negativo (no se consume citrato); **LIA:** K/K H₂S- (Alcalinización sin producción de sulfuros y con liberación de CO₂); **Catalasa:** positivo para la presencia de la enzima catalasa (presencia de burbujas por la liberación de oxígeno gaseoso); **Indol:** positivo para la presencia de la enzima triptofanasa (presencia de anillo rosa por la formación del complejo coloreado entre el indol y el p-dimetilamino benzaldehído); **Ureasa:** negativo (ausencia de la enzima ureasa, no existe degradación de urea); **Tinción GRAM:** bacilo Gram negativo

Anexo 4.

Pruebas de identificación de *E. coli*



MacConkey: Lac (+) , positivo para el consumo del lactosa; **TSI:** A/A H₂S- (producción de ácido sin producción de sulfuros y liberación de CO₂); **Citrato:** negativo (no se consume citrato); **LIA:** K/K H₂S- (Alcalinización sin producción de sulfuros y con liberación de CO₂); **Catalasa:** positivo para la presencia de la enzima catalasa (presencia de burbujas por la liberación de oxígeno gaseoso); **Indol:** positivo para la presencia de la enzima triptofanasa (presencia de anillo rosa por la formación del complejo coloreado entre el indol y el p-dimetilamino benzaldehído); **Ureasa:** negativo (ausencia de la enzima ureasa, no existe degradación de urea); **Tinción GRAM:** bacilo Gram negativo

Anexo 5.

Interpretación de los halos de inhibición

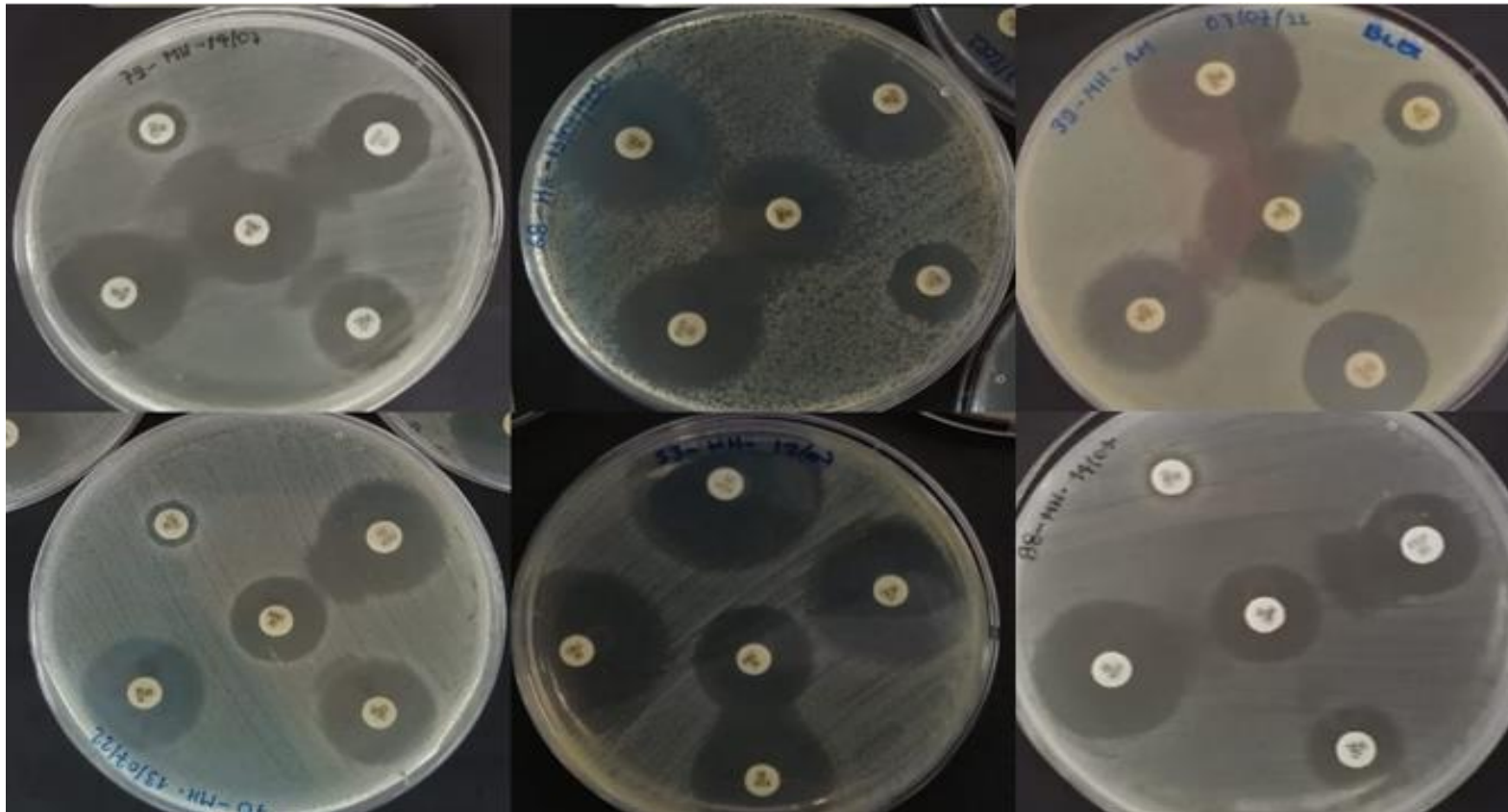
Familias de antimicrobianos	Agentes antimicrobianos	Abreviatura	Diámetro de la zona BreakPoint (mm)			
			Susceptible	Intermedio	SSD	Resistente
Agentes combinados β -lactámicos	Amoxicilina/ácido clavulónico	AMC 30	≥ 18	14-17		≤ 13
	Piperacilina/Taxobactam	TZP 110	≥ 25	21-24		≤ 20
Penicilina	Ampicilina	AM 10	≥ 17	14-16		≤ 13
	Cefepime	FEP 30	≥ 25		19-24	≤ 18
	Cefoxitina	FOX 30	≥ 18	15-17		≤ 14
Cefalosporinas	Ceftazidima	CAZ 30	≥ 21	18-20		≤ 17
	Ceftriaxona	CRO 30	≥ 23	20-22		≤ 19
	Cefuroxima	CXM 30	≥ 18	15-17		≤ 14
	Ertapenem	ETP 10	≥ 22	19-21		≤ 18
Carbapenémicos	Meropenem	MEM 10	≥ 23	20-22		≤ 19
	Amikacina	AK 30	≥ 17	15-16		≤ 14
Aminoglucósidos	Gentamicina	CN 10	≥ 15	13-14		≤ 12
Nitrofuranos	Nitrofurantoina	F 300	≥ 17	15-16		≤ 14
Fosfomicinas	Fosfomicina	FF 200	≥ 16	13-15		≤ 12
Antagonistas de la vía del folato	Trimetoprima / Sulfametoxazol	SXT 25	≥ 16	11-15		≤ 10
Quinolonas y fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	CIP 5	≥ 26	22-25		≤ 21

SSD: susceptible dependiendo de la dosis

Fuente: (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2021)

Anexo 6.

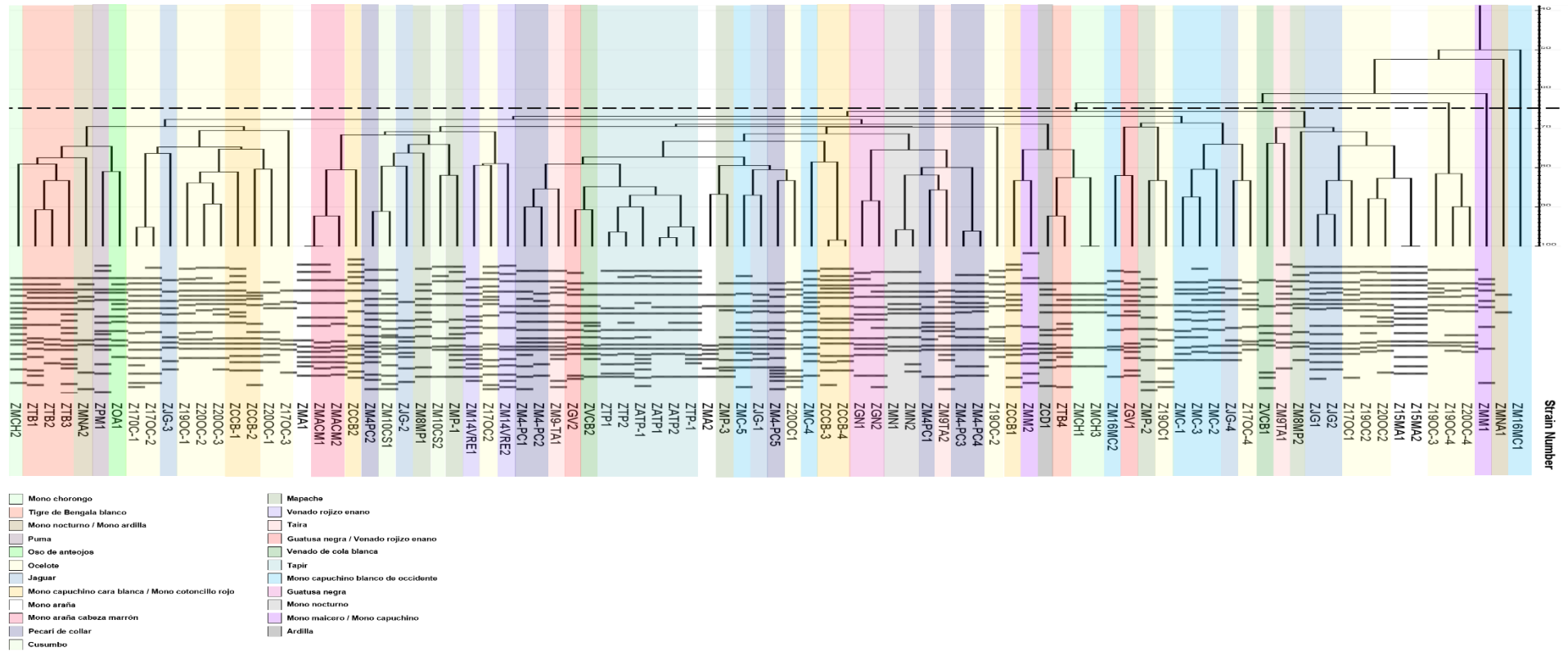
Aislados BLEE positivos



E. coli aislada de ocelotes (muestra 79), de mono capuchino cara blanca (muestra 68), de mono capuchino blanco de occidente (muestra 39), de mono nocturno (muestra 10), de jaguar (muestra 53) y de tapires (muestra 88) a partir de muestras fecales. Los aislados se obtuvieron a través de la prueba de sinergia con el disco AMC (centro) y las cefalosporinas de segunda generación (CXM), de tercera generación (CAZ y CRO) y de cuarta generación (FEP).

Anexo 7.

Dendrograma obtenido por análisis de conglomerados de fingerprint rep-PCR (GTG5)



El dendrograma se basa en el Coeficiente de similitud de Dice con el método de grupo de pares no ponderados con algoritmo de agrupamiento de promedios aritméticos (UPGMA).