



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TEMA:

“DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EMERGENTES EN AISLADOS DE *Escherichia coli* EN CANINOS DE LA CIUDAD DE AMBATO”

“Documento Final Del Proyecto de Investigación como requisito para obtener el Grado de Médico Veterinario y Zootecnista”.

AUTOR:

EDUARDO JAVIER NÚÑEZ ARCOS

TUTOR:

DR. WILLIAM RICARDO CALERO CÁCERES, PhD.

CEVALLOS- ECUADOR

2018

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“Yo, EDUARDO JAVIER NUÑEZ ARCOS, portador de cédula de identidad número: 1804581187, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado “DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EMERGENTES EN AISLADOS DE *Escherichia coli* EN CANINOS DE LA CIUDAD DE AMBATO” es original, auténtico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indica las fuentes de información consultadas.

Eduardo Javier Núñez Arcos.

DERECHOS DE AUTOR

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

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

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

Eduardo Javier Núñez Arcos.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por darme la vida y poder llegar a cumplir este objetivo que siempre soñé lograrlo.

También agradezco a mis padres y familia que con sus palabras de apoyo, su esfuerzo y sacrificio me han apoyado en mis días y noches de desvelo, sus palabras han sido mi pilar para seguir adelante y luchar por este sueño, a los propietarios de las clínicas veterinarias (Dr. Edgar Onofre y Dra. Cinthya Ramos) que me colaboraron durante este estudio.

Igualmente agradezco a los docentes de esta prestigiosa Universidad en especial a mi Tutor Dr. William Calero, a mi Asesor de Biometría Ing. Luciano Valle y a mi asesor de redacción técnica Dr. Darwin Villamarín quienes con sus conocimientos y apoyo fueron mi motivación a seguir hacia adelante a no desfallecer en el camino para lograr cumplir la meta que siempre me he propuesto

DEDICATORIA

Primeramente a Dios por permitirme estar aquí y poder cumplir mi meta, a mis padres por todo el apoyo que me brindaron durante todo este ciclo de vida, a mis amigos por ayudarme en los momentos que los necesitaba, a mi familia por sus palabras de apoyo, y poder llegar a la cima de este logro más en mi vida, ser un Médico Veterinario y Zootecnista.

INDICE DE CONTENIDO

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD	I
DERECHOS DE AUTOR	II
AGRADECIMIENTO	III
DEDICATORIA	IV
INDICE DE CONTENIDO	V
INDICE DE TABLAS.....	VIII
INDICE DE GRAFICOS.....	IX
INDICE DE FIGURAS.....	IX
INDICE DE ANEXOS	X
RESUMEN.....	1
SUMMARY	2
CAPÍTULO I.....	3
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO II.....	6
MARCO TEÓRICO O REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....	6
2.2 MARCO CONCEPTUAL.....	9
2.2.1 Variable Independiente	9
2.2.2 <i>Escherichia coli</i>	9
□ Características Generales	9
2.2.3 Variable Dependiente	10
□ β -lactamasas tipo Carbapenemasas	10
□ Resistencia a Colistina.....	11
CAPÍTULO III.....	12
HIPÒTESIS Y OBJETIVOS	12

3.1 HIPÓTESIS	12
3.2 OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS	12
3.2.1 Objetivo General:	12
3.2.2 Objetivos Específicos:	12
CAPÍTULO IV	13
MATERIALES Y MÉTODOS	13
4.1 UBICACIÓN DEL ENSAYO	13
4.1.1. Localización del área de estudio (muestreo)	13
4.1.2. Localización del laboratorio	13
4.2 CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR	13
4.3 EQUIPOS Y MATERIALES	14
4.4 Factores en Estudio	17
4.5 Tratamientos	17
4.6 Diseño Experimental	17
4.7 Variable respuesta	17
a) Toma de muestras	18
b) Preparación de medios de aislamiento	18
<input type="checkbox"/> Aislamiento Bacteriano en Agar Levine	18
<input type="checkbox"/> Aislamiento Bacteriano en Agar Mac Conkey	19
<input type="checkbox"/> Aislamiento bacteriano en Agua Peptonada	19
c) Almacenamiento de colonias bacterianas sospechosas	19
e) Pruebas Bioquímicas	20
<input type="checkbox"/> Agar Hierro Tres Azúcares (TSI)	20
<input type="checkbox"/> Utilización de Citrato	21
<input type="checkbox"/> Prueba de Catalasa	21
<input type="checkbox"/> Prueba de Indol	22
<input type="checkbox"/> Prueba de ureasa	22

f) Amplificación de genes resistentes mediante PCR	24
□ Extracción del DNA bacteriano	24
□ Técnica de PCR	24
A. Preparación del gel de agarosa	26
B. Electroforesis	26
CAPÍTULO V	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
RESULTADOS	28
DISCUSIÓN	38
CAPÍTULO VI.....	42
CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFIA Y ANEXOS	42
CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFIA	44
ANEXOS	52
CAPÍTULO VII	66
PROPUESTA.....	66
7.1. DATOS DE LA PROPUESTA.	66
7.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA	66
7.3. JUSTIFICACIÓN	67
7.4. OBJETIVOS.	67
7.5 ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD	67
7.6. METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO.	68
7.7. ADMINISTRACIÓN	68
7.8. PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN	68

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aislamiento de Escherichia coli en agar selectivo y diferencial.....	19
Tabla 2. Identificación de colonias mediante tinción Gram.	20
Tabla 3. Identificación de Escherichia coli mediante pruebas bioquímicas.	23
Tabla 4. Primers para amplificación de genes.	25
Tabla 5. Amplificación de genes de resistencia mediante PCR.....	27
Tabla 6. Animales resistentes a ceftriaxona de acuerdo al historial clínico.....	29
Tabla 7. Animales resistentes a ceftriaxona de acuerdo a su procedencia.....	29
Tabla 8. Patrones genotípicos de genes de resistencia a antibióticos	31
Tabla 9. Animales positivos a los genes de resistencia.....	35
Tabla 10. Animales positivos a los genes de resistencia analizados de acuerdo a la procedencia.	36

INDICE DE GRAFICOS

Gráfico 1. Animales positivos vs negativos resistentes al gen analizado. 36

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estandarización de la técnica de PCR multiplex con primers y controles. 30

Figura 2. Amplificaciones positivas del Gen mr-1 mediante PCR Singleplex 31

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Toma de muestras.....	52
Anexo 2. Aislamiento bacteriano.....	52
Anexo 3. Pruebas Bioquímicas.....	55
Anexo 4. Banco de cepas bacterianas.....	56
Anexo 5. Lisis Bacteriana.....	57
Anexo 6. PCR Muestras Compuestas (bla _{VIM} y bla _{KPC}).....	59
Anexo 7. PCR Muestras Individuales (Sul1).....	60
Anexo 8. PCR Muestras Individuales (tetA).....	60
Anexo 9. Condiciones de Reacción de PCR.....	61
Anexo 10. Descripción de la procedencia de los aislamientos de E. coli a partir de caninos en la ciudad de Ambato.....	62
Anexo 10. Descripción de la procedencia de los aislamientos de E. coli a partir de caninos en la ciudad de Ambato.....	63
Anexo 10. Descripción de la procedencia de los aislamientos de E. coli a partir de caninos en la ciudad de Ambato.....	64
Anexo 10. Descripción de la procedencia de los aislamientos de E. coli a partir de caninos en la ciudad de Ambato.....	65

RESUMEN

El objetivo de este estudio, fue identificar la presencia de genes de resistencia a antibióticos emergentes en aislados de *E coli* procedentes de caninos, por medio de la técnica PCR multiplex. El muestreo se realizó entre los meses de enero y marzo del 2018, en muestras de caninos de clínicas veterinarias de Ambato, provincia del Tungurahua. Se realizó hisopados rectales de un total de 148 caninos muestreados, de acuerdo a su procedencia clínica fueron 68 muestras de caninos sanos, 40 con enfermedades gastrointestinales, 11 con enfermedades respiratorias, 13 con enfermedades dermatológicas, 2 con enfermedades metabólicas y 14 con otras afecciones; y de acuerdo a su origen, 105 caninos fueron domésticos y 43 fueron callejeros. Se aislaron 114 cepas de *E. coli* resistentes a ceftriaxona, procedentes de 61 animales, luego fueron analizadas mediante PCR multiplex, se evaluaron 7 genes de resistencia a antibióticos de interés en medicina veterinaria y salud pública (*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA-48}*, *mcr-1*, *sulI* y *tetA*).

A partir del 41.21% (61/148; I.C. 95%: 33-48) de animales muestreados, se aislaron cepas de *E. coli* con fenotipo de resistencia a ceftriaxona. Mediante la técnica de PCR multiplex se detectó un porcentaje del 6.14% (I.C 95% 1.7-10) de cepas de *E. coli*, portadoras del gen *mcr-1*. No se detectaron amplificaciones positivas de genes de productores de carbapenemasas. Adicionalmente, el 29.82% (I.C 95% 21-37) presenta el gen de resistencia a sulfonamidas *sulI*, y el 55.26 (I.C 95% 46-64) dispone del gen de resistencia a tetraciclinas *tetA*. Los aislamientos de *E. coli mcr-1* positivo fueron aislados en perros sanos y con distemper canino; así como de animales domésticos y callejeros. Es necesario complementar la presente investigación, con la finalidad de detectar las vías de diseminación de los clones portadores del gen *mcr-1*, y evaluar si existe algún tipo de relación clonal entre aislamientos clínicos y veterinarios portadores de este gen y los aislados obtenidos en el presente estudio.

Palabras clave: *Escherichia coli*, mPCR, PCR, *mcr-1*, ceftriaxona, caninos.

SUMMARY

The aim of this research was the identification of the presence of emerging antibiotic resistance genes (ARGs) in *E. coli* isolates from canines, using the multiplex PCR technique. The study was screened between January and March of 2018, in canine samples from veterinary clinics in Ambato, Tungurahua, Ecuador. Rectal swabs was collected from 148 canine samples. According to clinical origin, were 68 healthy canine samples, 40 with gastrointestinal diseases, 11 respiratory diseases, 13 dermatological diseases, 2 metabolic diseases and 14 with other conditions. According with their origin, 105 canines were domestic and 43 stray dogs. We isolated 114 strains of *E. coli* resistant to ceftriaxone from 61 animals. Later, multiplex PCR was performed (7 ARGs) to antibiotics of interest in veterinary medicine and public health were evaluated (*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA-48}, *mcr-1*, *sulI* y *tetA*).

From 41.21% of sampled animals (61/148; 95% CI: 33-48), *E. coli* strains with ceftriaxone resistance phenotype were isolated. Using the multiplex PCR technique, 6.14% (I.C 95% 1.7-10) of strains of *E. coli* was carrying the *mcr-1* gene. No positive amplifications of carbapenemase producing genes were detected. Additionally, 29.82% of isolates (I.C. 95% 21-37) presents the sulfonamide resistance gene *sulI*, and 55.26% of isolates (95% CI 46-64) has the tetracycline resistance gene *tetA*. Isolates of *E. coli* *mcr-1* positive were isolated in healthy dogs and with canine distemper; as well as domestic and street animals. It is necessary to complement the present investigation, in order to detect the routes of dissemination of the clones carrying the *mcr-1* gene, and to evaluate if there is any kind of clonal relationship between clinical and veterinary isolates carrying this gene and the isolates obtained in the present study.

Key words: *Escherichia coli*, mPCR, PCR, *mcr-1*, ceftriaxone, dogs.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (WHO, del inglés *World Health Organization*), el problema de la resistencia a antibióticos, a nivel mundial es considerado de elevada prioridad sanitaria. Considerando esta problemática, dicha organización ha redactado un Plan de Acción Global frente al problema de la emergencia de las resistencias a antibióticos. Con la finalidad de cumplimentar estas metas, se considera estudiar el problema desde diferentes sectores y actores, que incluyan a la medicina humana, veterinaria, agropecuaria, financiera, ambiental y de los consumidores (Minnesota Department of Health, 2017; Queenan et al., 2016; World Health Organization, 2015b).

El uso excesivo de antibióticos en el sector pecuario y sanitario, así como una incorrecta prescripción y gestión de residuos, provocó un escalado en las frecuencias de resistencia de diferentes bacterias alrededor del mundo, originando uno de los mayores problemas de salud pública del siglo XXI (World Health Organization, 2017). Las densidades de estos compuestos en muchos ambientes, provocan una modificación de la estructura del microbioma, generando nuevos clones y manteniendo las poblaciones bacterianas resistentes (Gullberg et al., 2011; Gullberg et al., 2014; Sandegren, 2014).

La diseminación descontrolada de resistencia antimicrobiana causada por β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) es un problema significativo para la salud pública (Máttar & Martínez, 2007). Actualmente, el 70% de bacterias causantes de infecciones nosocomiales muestran resistencia, mínimo a un antibiótico usado comúnmente en sus tratamientos (Benavides, Aldama & Vázquez, 2005). Existe evidencias de una clara modificación del microorganismo y de resistencia global, debido al uso y sobreuso de antibióticos en el sector sanitario y veterinario (Rojas, León y Ramírez, 1972). La diseminación de genes multirresistentes se da por varios factores, tales como el inadecuado control de infecciones en los hospitales, la predisposición de hospitalizar pacientes gravemente enfermos, la migración excesiva y el sobreuso de antimicrobianos (Benavides et al., 2005).

Las bacterias zoonóticas representan un área de estudio de especial importancia sanitaria, ya que estos microorganismos tienen el potencial de transmitirse entre animales y humanos. Dichos patógenos pueden encontrarse en animales asintomáticos y en animales

enfermos (Pantozzi, Moredo y Vigo, 2010). Existen diversas bacterias zoonóticas; especial importancia tienen las enterobacterias, tales como: *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter sp*. Además, otros géneros como: *Salmonella sp*, *Brucella sp*, *Campylobacter sp* (Gómez, 2013). La bacteria *Escherichia coli*, por lo general, es el agente patógeno con mayor predisposición de causar infecciones, tanto en los animales como en el hombre, debido a que es un constituyente normal de la microbiota intestinal y tracto urogenital de estos individuos (Bentancor, 2006) Los caninos y felinos, son considerados una fuente de contaminación para humanos, debido a que se encuentran en contacto continuo con estas especies. Diversos estudios señalan que dichas especies suelen portar *E. coli* Verocitotoxigénico (VTEC), en su piel, heces y pelo (Fernández, Etcheverría, Padola & Parma, 1999). Las cepas de *E. coli* Shigatoxigénicas (STEC), se consideran parte de la microbiota de tres especies de rumiantes, tales como ganado bovino (21,1%), ovinos (66,6%), caprinos (56,1), además de otras especies como felinos (13,8), caninos (4,8%), porcinos (7,5%) y aves (<0,8%) (Bentancor, 2006).

La bacteria *E. coli* multirresistente representa un desafío desde el punto de vista clínico. Los mecanismos asociados a esta bacteria están ampliamente documentados en humanos. Se encuentran disponibles estudios en los que se encuentra una relación directa entre los microorganismos presentes en especies diferentes que conviven en proximidad (Dolejska et al., 2011). Considerando que los animales domésticos y los humanos se encuentran en contacto directo, la compartición de microorganismos entre humanos y mascotas puede significar un elevado riesgo (Wagner, Gally, & Argyle, 2014).

Las bacterias multirresistentes son reservorios de múltiples elementos genéticos (genes, integrones, transposones, plásmidos) que confieren sus fenotipos de resistencia. (Woodford, Turton, & Livermore, 2011). En la actualidad, son de especial interés sanitario los genes codificadores de resistencias a los antibióticos colistina y a los microorganismos productores de carbapenemasas, los cuales representan el último recurso en quimioterapia antibiótica para el tratamiento de infecciones severas (Johnson & Woodford, 2013; Paterson & Harris, 2016; A. M. Queenan & Bush, 2007; Zhi, Lv, Yu, Doi, & Liu, 2016). La diseminación y evolución de estos mecanismos de resistencia, alrededor del mundo, está creciendo de manera considerable. Motivo por el cual, es necesario realizar evaluaciones epidemiológicas que representen una alerta sanitaria temprana.

El objetivo de esta investigación es determinar la presencia de genes de resistencia a antibióticos emergentes en aislados de *Escherichia coli* en caninos de la ciudad de Ambato, provincia del Tungurahua, con la finalidad de evaluar la potencial diseminación de estos determinantes de resistencia en animales de compañía de la provincia.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO O REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

El estudio de la diseminación de genes de resistencia a colistina y carbapenémicos, los cuales son antibióticos utilizados como último recurso en el tratamiento por infecciones bacterianas en el sector sanitario, es considerado de prioridad sanitaria por diferentes agencias de control sanitario en el mundo (Centers for Disease Control and Prevention, 2017). La colistina (Polimixina E), ha sido utilizado en medicina veterinaria de manera frecuente (Rossolini, 2015). La resistencia a colistina, genéticamente, había sido identificada únicamente como mutaciones en el cromosoma bacteriano, y no había sido demostrada su transferencia entre bacterias (Catry et al., 2015). Sin embargo, en noviembre del 2015 fue descubierto un mecanismo nuevo de resistencia a colistina, mediada por un plásmido, llamada *mcr-1* (Liu et al., 2016). En los últimos años, se han realizado una gran cantidad de investigaciones a nivel mundial que evidencian la elevada diseminación que tiene este gen en muestras de humanos, animales, alimentos y ambientales (Skov & Monnet, 2016).

El gen *mcr-1* fue identificado por primera vez a partir de un clon resistente a colistina en China, aislado a partir de un hombre de 50 años con glomerulonefritis en octubre del 2015. Este paciente trabajaba en una tienda de mascotas, por lo que se decidió hacer un estudio del establecimiento para detectar la posible transmisión de este gen entre animales de compañía y una persona. Se tomaron 55 muestras fecales de 39 caninos y 14 felinos en la tienda de mascotas donde trabajaba el hombre. El aislamiento de *E. coli* se realizó en Agar MacConkey. Además, se prepararon muestras de ADN brutos de los aislamientos, para realizar la prueba de PCR. Entre ellos, se detectó 6 positivos para *mcr-1* por PCR y secuenciación (4 de caninos y 2 de felinos). Todos los aislamientos fueron resistentes a colistina, cefalosporinas, Polimixina B, Gentamicina y Ciprofloxacina mediante la técnica de dilución en agar (Zhang, Doi, Huang, & Li, 2016).

Un estudio realizado recientemente en Cumaná (Venezuela) tuvo como objetivo, identificar el gen *mcr-1* de *E. coli* en aislamientos de muestras fecales de humanos y animales. Para lo cual se tomaron 93 muestras que fueron colectadas en agosto del 2015, en el siguiente orden: heces fecales de clínicas humanas (16 muestras), heces fecales de

cerdos (17 muestras), caninos (8 muestras), aves de corral (16 muestras) y aguas residuales (36 muestras). Posteriormente, se realizaron aislamientos de estas muestras en agar MacConkey. Dos aislamientos fueron positivos al gen *mcr-1* de *E. coli*, en el cual se determinó por Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR). Además, realizaron pruebas de resistencia antimicrobiana, usando micro dilución en placas de microvaloración, en las cuales se detectó resistencias a betalactámicos, aminoglicósidos, fluoroquinolonas, sulfonamidas, tetraciclinas y trimetoprim (Delgado, Ovejero, Abadia & Gonzalez, 2016).

Una investigación realizada en Alemania, en el cual aislaron 62 cepas de *E. coli*, previamente tomadas de muestras de humanos y animales, encontraron la presencia del gen *mcr-1* resistente a colistina en 4 aislamientos albergados proveniente de carne de pavo. Además se estableció que hay una combinación con el gen *bla_{CTX-M}*, los cuáles se realizaron pruebas de transferencia mediante conjugación, indicando que no fueron transferibles, es decir ninguno de los genes fue plásmido-codificado (Falgenhauer et al., 2016).

La resistencia a colistina mediada por el gen *mcr-1* fue reportada por primera vez en Ecuador en el año 2016. La muestra fue obtenida del líquido peritoneal de un joven de 14 años, el cual acudió al hospital con apendicitis. Posteriormente, se realizaron el aislamiento de la bacteria *E. coli*. Por consiguiente, se realizaron pruebas bioquímicas para la detección del gen y la resistencia a colistina con una concentración mínima inhibitoria para la cepa fue de 8 mg/ml. Este gen fue susceptible a carbapenems y resistente a tigeciclina, además esta cepa contenía el gen *bla_{CTX-M-55}* (Paredes, Barba, & Zurita, 2016).

Las Enterobacterias resistentes a carbapenémicos (CPE, del inglés *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*), representan una de las principales preocupaciones de salud pública, debido a que estos microorganismos son susceptibles a muy pocos antibióticos (Rossolini, 2015). Los antibióticos carbapenémicos son considerados como el último recurso terapéutico frente a organismos Gram-negativos (Sekirov et al., 2016). Sin embargo, la presencia de microorganismos resistentes a este tipo de compuestos se encuentra incrementándose alrededor del mundo, desde su primera identificación hace 20 años (El Salabi, Walsh, & Chouchani, 2012; P. Nordmann, 2014; Piedra-Carrasco et al., 2017; A. M. Queenan & Bush, 2007).

De acuerdo al Centro de Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC, del inglés *Centers for Disease Control and Prevention*), 2017 entre los organismos de elevada prioridad a ser reportados, se incluyen a Enterobacterias productoras de carbapenemasas que contienen los genes KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemasas*), NDM-1 (*New.Delhi Metallo-beta-lactamasas*), OXA-48 (*Oxacillinasa-48*), mcr-1 (*Plasmid-mediated Colistin Resistance*), VIM (*Verona Integron-Encoded Metallo-beta-lactamasa*) (Centers for Disease Control and Prevention, 2017).

Uno de los recientes *NDM-1* descritos en 2009, fue de un paciente de origen indio hospitalizado en Suecia el cual regresaba de Nueva Delhi, en una cepa de *Klebsiella pneumoniae* tomada de una muestra de orina (Yong et al., 2009). Las cepas de *NDM-1*, fueron resistentes a casi todos los antibióticos excepto a tigeciclina y colistina. Estas beta-lactamasas después fueron descritas en varias cepas bacterianas, especialmente en enterobacterias: no solo en *Klebsiella* sino también *E. coli*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* (Johnson & Woodford, 2013).

El primer reporte de un *NDM-1* organismo productor en medicina veterinaria fue en un asilamiento de *E. coli* perteneciente a un gato. Además estos autores describen 5 *NDM-1* de origen canino (Shaheen, Nayak, & Boothe, 2013). Los factores de riesgos para adquirir *NDM-1* positivos incluyen personas con historial de viajes al subcontinente indio. El primer reporte de *OXA-48* en aislamientos de *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* en medicina veterinaria fueron descritos en Alemania en 6 perros con infecciones nosocomiales (Stolle et al., 2013).

Setenta y cinco muestras de heces fecales de mascotas sanas (39 de caninos y 36 de gatos) fueron tomadas en un estudio realizado en Portugal, el objetivo de este estudio fue determinar los genes resistentes de *E. coli* a tetraciclinas. Un total de 144 aislamientos de *E. coli* fueron determinados (78 de caninos y 66 de gatos), mostrando los siguientes resultados: El 20 % de los aislados mostraron resistencia a tetraciclina, y el 12-15% resistencia a ampicilina o estreptomicina. Además, se detectaron genes de β -lactamasa en todos los aislados resistentes a ampicilina (17 %) y se detectó un gen *bla*_{TEM} en 12 de ellos. Otros dos de estos aislamientos resistentes a la ampicilina de un canino mostraron resistencia a cefotaxima y aztreonam y albergaron los genes que codifican β -lactamasas *CTM-XI* y *OXA-30*. También se encontraron genes *tet (A)* y/o *tet (B)* en todas las cepas resistentes a tetraciclinas (Costa, Poeta, Sáenz, Coelho, Matos & Vinuéd, 2008).

CPE y otras bacterias productoras de carbapenemasas han aparecido de manera limitada en humanos, pero también se han descrito en animales, de especial importancia en animales de granja. Un estudio sobre la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* con *VIM-2* y *Acinetobacter baumannii* con *OXA-23*, fue reportado recientemente en Líbano en animales de producción (Fischer et al., 2012). Existen casos raros de CPE encontrados en animales de compañía, específicamente en tres estudios que fueron detectados *E. coli* productor de *OXA-48* Y *Klebsiella pneumoniae* en perros de Alemania (Stolle et al., 2013), *NDM-1* productor de *E. coli* de perros y gatos en Estados Unidos (Shaheen et al., 2013) Hoy en día, existen pocos estudios sobre CPE en animales de compañía por lo que se debe realizar más investigaciones para determinar la existencia de estos genes de resistencia, que son un grave problema para la salud pública y sanitaria (González-Torralba et al., 2016).

2.2 MARCO CONCEPTUAL






2.2.1 Variable Independiente

Existen evidencias científicas que correlacionan una mayor probabilidad a detectar enterobacterias con potencial patogénico en animales callejeros, que en animales de casa (Tamang et al., 2012; Tsai, Huang, Lin, Lien, & Chou, 2007). En base a esta evidencia, en este estudio se plantea evaluar las diferencias existentes en los perfiles de resistencia a antibióticos emergentes, de aislados de *Escherichia coli* de perros que proceden de dos hábitats diferentes: perros callejeros y perros de casa.

2.2.2 *Escherichia coli*

Es un bacilo Gram-negativo, anaerobio facultativo perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Esta bacteria coloniza el intestino después del nacimiento tanto en humanos como en animales, siendo así un microorganismo de microbiota normal, pero existen cepas que son patógenas y causan daño al hospedador (Willey, Sherwood, Woolverton, & Prescott, 2017).

✓ Características Generales

-  Bacilo Gram negativo
-  Anaerobio facultativo
-  Son móviles (flagelos peritricos)
-  Catalasa positivo
-  Oxidasa negativo

- ✚ No forman esporas
- ✚ Son capaces de reducir nitratos a nitritos.
- ✚ Miden 0,5 u de ancho por 3 u de largo.
- ✚ Tienen la capacidad de fermentar glucosa y lactosa con producción de gas.
- ✚ Generan colonias de color rosado en agar MacConkey.
- ✚ Producen colonias de brillo metálico en Agar E.M.B (eosina y azul de metileno) (Becton Dickinson BD, 2013; Willey et al., 2017).

2.2.3 Variable Dependiente

De acuerdo a sus características genotípicas, cada aislado de *E. coli* presentará un patrón de resistencia, el cual dependerá de su codificación genética. En este estudio, planteamos la detección de los genes de resistencia a: colistina (*mcr-1*) y betalactamasas productoras de carbapenemasas (*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{VIM}*), así como de los genes de resistencia a tetraciclina (*tetA*) y de resistencia a sulfonamida (*sulI*).

✓ **β-lactamasas tipo Carbapenemasas**

Existen dos tipos de carbapenemasas: carbapenemasas tipo serina, debido a que poseen un residuo de serina en un sitio activo y las metalo-β-lactamasas, estas enzimas requieren cationes divalentes en su sitio activo, como el zinc, siendo un cofactor para su actividad enzimática.

Además las carbapenemasas tipo serina se subdividen: serin-carbapenemasas clase A del tipo *SME*, *IMI-1* y *NMC-A*; serin-carbapenemasas del tipo *KPC*; serin-carbapenemasas del tipo GES-2 y carbapenemasas del tipo serina de la clase D (oxacilinasas).

Las serin-carbapenemasas clase A tipo *SME*, *IMI-1* y *NMC-A*, tienen las siguientes características: 1. Tienen gran capacidad hidrolítica frente a imipenem que meropenem; 2. Generan resistencia a aztreonam pero no a las cefalosporinas de tercera generación; 3. Se inhiben con ácido clavulánico, y 4. se encuentran en los cromosomas bacterianos y suelen inducirse.

Las serin-carbapenemasas del tipo *KPC*, sus genes codificadores fueron encontradas en plásmidos. Tienen alta actividad hidrolítica frente a aminopenicilinas, ureidopenicilinas, aztreonam y los carbapenems, y una mínima actividad hidrolítica frente a cefalosporinas de tercera generación.

La serin-carbapenemasas del tipo *GES-2*, apare debido a la sustitución de aminoácidos de la *GES-1*, que pertenece al grupo de β -lactamasas de espectro extendido no derivados de *TEM* o *SHV*, hasta el momento se ha reportado en una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* en Sudáfrica.

Las carbapenemasas tipo serina de la clase D (oxacilinasas). Poseen hidrólisis leve a imipenem y meropenem, no hidrolizan cefalosporinas de espectro extendido y aztreonam, con excepción de *OXA-27*. Se inhiben con ácido clavulánico, con excepción de *OXA-23*.

Las metalo- β -lactamasas poseen dos familias importantes, la *VIM* y la *IMP*. Estas metalo- β -lactamasas transfieren sus genes casetes mediante integrones tipo 1 y en algunas ocasiones por medio de plásmidos o transposones.

La primera metalo- β -lactamasa fue aislada en Japón en 1991, en una *Pseudomona aeruginosa* en un plásmido. Estas generan resistencia a los β -lactámicos (oxiimino cefalosporinas, cefamicinas y carbapenem), aminoglicósidos y quinolonas, además tienen sensibilidad variable al aztreonam. Un caso detectado en Colombia, identificó la *VIM-2* y la *VIM-8* en *Pseudomonas aeruginosa* (Suarez, Kattán, Guzmán, & Villegas, 2006).

✓ Resistencia a Colistina

Actualmente, se ha registrado el gen denominado *mcr-1* (Plasmid-mediated Colistin Resistance) que genera resistencia a colistina/Polimixina y que se localiza en elementos genéticos móviles (plásmidos).

El gen *mcr-1*, que codifica la enzima de la familia de la fosfoetanolamina transferasa, es la encargada de modificar la estructura del lípido A de la pared bacteriana y así impide la interacción de la bacteria con las polimixinas, provocando resistencia in vitro e in vivo (Caniaux, van Belkum, Zambardi, Poirel, & Gros, 2017).

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

H1: Existe la presencia de genes resistentes a antibióticos emergentes en aislados de *Escherichia coli* en caninos de la ciudad de Ambato.

3.2 OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS

3.2.1 Objetivo General:

- Determinar la presencia de genes de resistencia a antibióticos emergentes en aislados de *Escherichia coli* en caninos de la ciudad de Ambato, provincia del Tungurahua, con la finalidad de evaluar la potencial diseminación de estos determinantes de resistencia en la provincia.

3.2.2 Objetivos Específicos:

- Aislar e identificar *Escherichia coli* en aislamientos de caninos.
- Detectar la presencia de genes de resistencia a antibióticos emergentes en los aislados de *E. coli* por medio de PCR multiplex.
- Evaluar las diferencias entre los perfiles de resistencia a antibióticos emergentes entre aislados de *E. coli* de animales domésticos y de animales callejeros.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 UBICACIÓN DEL ENSAYO

4.1.1. Localización del área de estudio (muestreo)

La recolección de muestras de análisis, fueron tomadas en 3 diferentes clínicas veterinarias, pertenecientes a la ciudad de Ambato, provincia del Tungurahua (nombres no revelados por concepto de confidencialidad); además en 3 diferentes albergues de animales callejeros de la misma ciudad, y en el hospital veterinario de la Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias Agropecuarias.

Ambato posee una superficie: 35 km², una altitud de 2577.067 msnm, longitud W 78° 37'11'', latitud SUR 1°14'30''. Su población es de 330.000 habitantes aproximadamente. Su temperatura media es de entre 12 - 20°C.

4.1.2. Localización del laboratorio

La experimentación de este estudio se llevó a cabo en los laboratorios de investigación de bacteriología, química, laboratorio de microbiología ambiental y agrícola y biología molecular, pertenecientes al Centro de Investigaciones Agropecuarias de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, ubicada en el sector Querochaca, cantón Cevallos, provincia de Tungurahua, ubicado a 19 km de la ciudad de Ambato, con las siguientes coordenadas geográficas: 1°22'02" de latitud Sur y 78°36'20" de longitud Oeste, altura de 2860 msnm, de clima templado.

4.2 CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR

Los laboratorios cuentan con condiciones de ambiente controlado, conservándose a una temperatura promedio de 20°C y una humedad del 48%. El detalle de las condiciones de incubación bacteriológica y reacciones moleculares son detalladas para cada experimento en el apartado 4.7. Variables respuesta.

4.3 EQUIPOS Y MATERIALES

EQUIPOS DE LABORATORIO

DETALLE	CANTIDAD #
Autoclave M11 UltraClave MIDMARK	1
Balanza analítica Cap. 150 g (1g)	1
Estufa bacteriológica +5°C-120°C	1
Termociclador Life Technologies Simply Amp	1
Transiluminador UV enduro TM GDS Tower	1
Cámara de electroforesis OWL Easycast Thermo Scientific	1
Mechero Bunsen	1
Fuente de poder	1
Nevera (4°C)	1
Congelador (-20°C)	1
Cabina de flujo laminar Bioseguridad 2 Thermo Scientific	1
Microcentrífuga Sorvall Legend Micro i7	1

INSTRUMENTOS DE LABORATORIO

Caja de portaobjetos	2
Espátula	2
Asa de inoculación	2

Matraz de 300 mL	4
Cajas mono Petri plásticas	200
Pipetas x 10 ml	3
Mechero de alcohol	2
Gradilla	3
Juego de pipetas automáticas	1
Puntas para pipetas	1 de cada tipo
Tubos para microcentrífuga	1000
Tubos 0.2 mL para PCR	500
Tubos de ensayo	40
Tubos de ensayo con tapa	30
Hisopos de plástico x 15 cm	400

REACTIVOS DE LABORATORIO

Agar MacConkey	500 g
Agar Levine	500 g
Agua peptonada	15 g
TSI	125 g
Prueba de Indol	100 g
Prueba de urea	100 g
Agua oxigenada	1 frasco 100 mL
Prueba de Citrato	100 g

REACTIVOS PARA PCR

Puntas de pipetas 200 ul	500 unidades
Puntas de pipetas 20 ul	500 unidades
Ultrapure TM 10X TBE buffer 1L	1 unidad
Invitrogen	
DREAMTAQ master mix	4 unidades
Microtubos eppendorf microamp	1000 unidades

INSUMOS

Termo de transporte 10 L	1
Cofias	caja x 100 unidades
Mascarillas	caja x 100 unidades
Guantes de examinación	8 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	4 rollos
Hilo chillo	1 bobina 250 g
Alcohol antiséptico	1 litro
Gel anti-bacterial	1 frasco
Jabón liquido	1 frasco
Cloro	1 galón

Algodón	1 bolsa x 500 gr
Gasa	1 Rollo 06 x 100 m
MATERIALES DE ESCRITORIO	
Computadora	1
Cámara fotográfica	1
Hojas de papel bond A4	1 paquete
Impresora	1
Esferos	5 unidades
Ficha para toma de muestras	30

4.4 Factores en Estudio

- Genes de Resistencia Antimicrobiana: *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM}, *mcr-1*, *tetA* y *sul1*.

4.5 Tratamientos

No existen tratamientos, debido a que este es un estudio descriptivo, en que se obtuvo muestras de diferentes animales (domésticos y callejeros) que fueron tratados en diferentes clínicas veterinarias de la ciudad de Ambato. De dichos animales, se realizaron aislamientos selectivos de *E. coli*, en donde después se evaluó la presencia de genes de resistencia a antibióticos.

4.6 Diseño Experimental

En base a los resultados obtenidos se efectuó una estadística descriptiva (prevalencia de bacterias resistentes, prevalencia de genes de resistencia, intervalos de confianza). Por la naturaleza de la investigación no se realizó un diseño experimental.

4.7 Variable respuesta

Identificación de genes de resistencia. Para el cual se aplicó el siguiente procedimiento:

a) Toma de muestras

- ✓ Las muestras fueron obtenidas de caninos sin distinción de sexo, raza y edad, atendidos en 3 diferentes clínicas veterinarias, pertenecientes a la ciudad de Ambato (nombres no revelados por concepto de confidencialidad); además en 3 diferentes albergues de animales callejeros de la ciudad de Ambato, y en el hospital veterinario de la Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias Agropecuarias, ubicado en el cantón Cevallos (10 km de Ambato).
- ✓ Se colectó una población de 148 muestras, el cual 112 muestras fueron procedentes de clínicas veterinarias, 33 muestras de refugios animales y 3 muestras del hospital veterinario, teniendo en cuenta que presentaron diferentes tipos de afecciones (bacterianas, virales, respiratorias, digestivas, metabólicas, dermatológicas, entre otras). El detalle de la anamnesis se encuentra en la tabla 6.
- ✓ Antes de la toma la muestra, se realizó una inspección general del estado del animal para determinar si posee alguna patología, y luego se procedió a tomar una muestra de cada individuo.
- ✓ La muestra fue colectada mediante hisopado rectal, posteriormente se le colocó en un tubo de ensayo con tapa, el cual contenía en su interior 5 ml de medio PBS, tampón fosfato (Phosphate Buffered Saline), por sus siglas en inglés y luego se transportaron en cajas térmicas con hielo artificial hasta el laboratorio de bacteriología, perteneciente a la Universidad Técnica de Ambato, facultad de Ciencias Agropecuarias, carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- ✓ Las muestras fueron identificadas con información básica como: clínica veterinaria, procedencia, estado del animal, número de muestra, observaciones, y antibióticos aplicados anteriormente.

b) Preparación de medios de aislamiento

- **Aislamiento Bacteriano en Agar Levine**

Una vez homogenizada las muestras con medio PBS, se procedió a realizar el aislamiento de *E. coli*. Se introdujo en el medio con una asa estéril por flameado directo, se procedió a realizar una siembra en Agar Levine con una concentración de 5 µg de Ceftriaxona/mL, en cuatro cuadrantes mediante la técnica de estría escocesa, posteriormente fueron incubados a 37°C durante 24 horas.

- **Aislamiento Bacteriano en Agar Mac Conkey**

Las muestras en las que se observaron crecimiento bacteriano, se tuvo en cuenta, las colonias que muestren un color negro verdoso con brillo metálico, posibles sospechosas a *E. coli*. Posteriormente se tomaron 2 colonias de este medio y luego se realizó la siembra en agar MacConkey con la misma concentración de antibiótico mencionada anteriormente y mediante la misma técnica de siembra, luego fueron incubados a 37°C durante 24 horas.

En la tabla 1 se muestran los resultados esperados del aislamiento en agar selectivo y diferencial (Sneath, Mair, Sharpe, & Holt, 1986).

Tabla 1. Aislamiento de *Escherichia coli* en agar selectivo y diferencial.

Medio de cultivo	Presencia	Ausencia
Agar Levine	Verdosas con o sin presencia de brillo metálico y centro negro azulado.	Mucosa, rosa púrpura (<i>Klebsiella pneumoniae</i>).
Agar MacConkey	Fermentadores de lactosa: colonias rosadas-rojizas.	No fermentadores de lactosa: colonias del color del medio, incoloras (<i>Salmonella spp</i>).

Fuente: (Sneath et al., 1986)

- **Aislamiento bacteriano en Agua Peptonada**

Se procedió a observar el crecimiento en este medio, determinando que las colonias presenten un color rosado, que significa lactosa positiva. Se seleccionó la colonia que esté bien separada de las demás y que tenga forma bien definida, posteriormente se tomó una alícuota de cada crecimiento y se le colocó en un tubo con 5 mL de agua peptonada y 2.5 µl de Ceftriaxona, finalmente se dejó a incubar a 37°C durante 24 horas.

c) Almacenamiento de colonias bacterianas sospechosas

Las colonias bacterianas sospechosas a *E. coli*, se conservaron por criopreservación a -20°C. Previamente se inoculó, e incubó, como se menciona anteriormente, consiguiendo se añadió glicerol hasta obtener una concentración del 30%, el cual, se añadió 700 µl del

cultivo, más 300 µl de glicerol, luego se colocó en tubos crioviales de 1,5 mL por stock y posteriormente se realizó pruebas bioquímicas (Ashwood-Smith, 1985).

d) Tinción Gram

Luego se procedió a tomar una alícuota de la bacteria aislada con un asa de cultivo previamente estéril y se colocó en un porta-objetos, se agregó una gota de solución fisiológica y se fijó el frotis con la ayuda de un mechero.

Se añadió sobre el frotis una gota de violeta de genciana, se dejó actuar por un minuto, luego se procedió a limpiar la lámina con agua corriente, se añadió una gota de lugol y se repitió el mismo procedimiento. Una vez limpiada la muestra, se agregó una solución de alcohol-acetona y se dejó actuar por 10 segundos se lavó con agua corriente, y finalmente se aplicó un colorante de contraste como la safranina se dejó actuar por 30 segundos y se lavó con agua corriente y se observó en el microscopio. En el cuadro 2 se muestran los resultados esperados de la Tinción Gram (Willey et al., 2017).

Tabla 2. Identificación de colonias mediante tinción Gram.

Identificación bacteriana	Presencia
Gram-negativo	Colonias color granate o rojo- rosadas
Gram positivo	Colonias color violeta azulado

Fuente: Willey et al. (2017)

e) Pruebas Bioquímicas

Las colonias sospechosas de *E. coli* obtenidas en agar Levine y MacConkey se confirmó con las siguientes pruebas bioquímicas:

Antes de realizar las pruebas bioquímicas, se requiere que los aislados sean sembrados e incubados a 37°C durante 18-24 horas (Sneath et al., 1986).

- **Agar Hierro Tres Azúcares (TSI)**

Fundamento: determina la capacidad de un microorganismo de fermentar hidratos de carbono en un medio de crecimiento con o sin producción de gas. Cuando se produce

fermentación de este medio provoca acidificación con cambio del indicador (rojo fenol) al amarillo.

Detecta producción de sulfuro de hidrógeno (SH₂), por ennegrecimiento del medio debido a la formación de sulfuro ferroso.

Técnica:

- ✚ Se inoculó la superficie del medio con estría y el fondo mediante punción con la ayuda de una aguja de siembra previamente estéril.
- ✚ Se incubó a una temperatura de 37°C.
- ✚ Posteriormente se interpretó los resultados luego de 24 horas post incubación (Laboratorios Britania, 2012).

- **Utilización de Citrato**

Fundamento: se utiliza para determinar la capacidad de un microorganismo de utilizar citrato como fuente de carbono, para el metabolismo, generando alcalinidad.

Técnica:

- ✚ Se inoculó la superficie del pico con estría solamente, no se inoculó el fondo.
- ✚ Se incubó a 37°C por 24 h (MacWilliams, 2012).

- **Prueba de Catalasa**

Fundamento: Es una hemoproteína de estructura similar a la hemoglobina, con la diferencia que las moléculas de hierro se encuentran en estado oxidativo en lugar de reducido, con excepción en estreptococos. La mayoría de bacterias aerobias y anaerobias facultativas poseen esta actividad (Fernández et al., 2010). La catalasa es una enzima capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua ($H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$), siendo evidente esta reacción por la formación de burbujas de gas (Rojas, 2011).

Técnica

- ✚ Se colocó sobre un portaobjetos una colonia de un cultivo en 24 horas.
- ✚ Se Adicionó sobre este 2 gotas de peróxido de hidrógeno al 3% (Willey et al., 2017).

- **Prueba de Indol**

Fundamento: es un producto del metabolismo del triptófano. Cuando el indol detecta la presencia de este aminoácido en un medio se combina con diferentes aldehídos y forma un compuesto coloreado. Como indicador de la existencia de aldehído, se usa el reactivo de Kovacs (Macwilliams, 2013).

Técnica

- ✚ Se generó biomasa en agua peptonada con la bacteria a evaluar (en cultivo puro), con las condiciones de temperatura óptimas para cada bacteria, durante 18-24 horas.
- ✚ Posteriormente, se añadió unas gotas reactivo de Kovacs (2-3) sobre la biomasa en un tubo de ensayo (tomar precauciones).
- ✚ Se observó sobre la superficie del tubo la formación de un anillo de color fucsia (reacción positiva) o amarillo/incolora (reacción negativa).

- **Prueba de ureasa**

Fundamento: los microorganismos capaces de hidrolizar la urea gracias a la enzima ureasa, liberan amoníaco lo cual genera cambio de color rojo en el medio. El agar urea de Christensen sirve para detección de cantidades mínimas de amoníaco en aquellos microorganismos que producen pequeñas concentraciones de ureasa, es efectivo el uso de este método, con 1% de positividad para *E. coli* (Bachmeier, Williams, Warmington, & Bang, 2002).

Técnica

- ✚ Se inculó, el cultivo mediante punción en la superficie, se dejó a incubar durante 24 horas, y se procedió a realizar la lectura.

Tabla 3. Identificación de *Escherichia coli* mediante pruebas bioquímicas.

Medio de Cultivo	Presencia / Positivo	Ausencia / Negativo
TSI (Agar Azúcares)	Tres Pico ácido (amarillo), fondo ácido (amarillo). Fermentación de lactosa, y/o sacarosa. Aparición de burbujas o fragmentación del medio (producción de gas).	Pico alcalino (rojo), fondo alcalino (rojo). Ausencia de fermentación de azúcares (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>). Pico alcalino (rojo), fondo ácido (amarillo). Fermentación de glucosa, no fermenta lactosa y sacarosa (<i>Shigella spp</i>).
Citrato de Simmons	color verde original	Color azul
Reacción de Indol	Formación de un halo fucsia en la interfase del medio.	Ausencia de modificación del medio.
Prueba de catalasa	Efervescencia antes de 20 seg.	Ausencia de efervescencia
Prueba de ureasa	Tubo amarillo	Tubo fucsia

Fuente: (Willey et al., 2017)

f) Amplificación de genes resistentes mediante PCR

✓ Extracción del DNA bacteriano

Se generó biomasa a partir de los cultivos criopreservados. Para reactivarlos, se tomó 50 µl de muestra conservada y se la transfirió a 5 mL de agua peptonada con 5 µg/mL de ceftriaxona, posteriormente fue incubada a 37 °C durante toda la noche. La biomasa generada fue transferida a un tubo eppendorf de 1.5 ml, luego se centrifugó a 10000 revoluciones por minuto (rpm/min), durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante dejando solo el pellet, y posteriormente se agregó 500 µl de agua destilada estéril, luego se calentó mediante baño maría a 100°C durante 10 minutos y se enfrió a -20°C por 10 minutos. El cual, nos sirvió como muestra de DNA que posteriormente fue analizado mediante PCR multiplex (Padilla, Dapena, Martínez , Bárcena & García, 2010).

✓ Técnica de PCR

Para dicho procedimiento se utilizó 16 primers, correspondientes a 8 genes, para detectar la presencia de diferentes genes resistentes a antimicrobianos. Para la reacción se utilizó un volumen final de 25 µl por cada muestra. En la tabla 4 se muestra el proceso de aplicación de muestras en cada primer.

Primero se calculó la cantidad de reactivo que se necesita de acuerdo a la cantidad de muestras que fueran analizadas, más dos controles, teniendo en cuenta que se utilizó las siguientes cantidades: 12,5 µl de Master Mix (DreamTaq), 0,5 µl del primer 1 (30 µM), 0,5 µl del primer 2 (30 µM) y 9 µl de agua libre de nucleasas.

Posteriormente en una zona blanca, es decir libre de contaminación, y en una cabina de bioseguridad 2, se realizó la mezcla de todos los reactivos mencionados anteriormente, en un tubo eppendorf de 1,5 mL previamente estériles, y luego se dispensó 22.5 µl en un tubo eppendorf de 0,2 ml estériles.

Luego en una zona gris, es decir en una zona apta para cultivos bacteriológicos, se rotuló de acuerdo al código utilizado de la muestra, y se agregó 2.5 µl del DNA extraído anteriormente, a cada tubo eppendorf de 0.2 mL, hasta un volumen final de 25 µl.

Finalmente, se colocó en el termociclador, se añadió la reacción de acuerdo al gen analizado y se esperó hasta que termine la reacción. En el anexo 9 se detalla los ciclos aplicados para cada gen analizado.

Tabla 4. Primers para amplificación de genes.

Nombre del primer	Secuencia (5'-3')
KPC-F	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG
KPC-R	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG
NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC
NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC
IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC
IMP-R	GGTTTAAAYAAAACAACCACC
OXA48-F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC
OXA48-R	CATCAAGTTCAACCCAACCG
VIM-F	GATGGTGTTTGGTCGCATA
VIM-R	CGAATGCGCAGCACCAG
MCR1-F	GGGTGTGCTACCAAGTTTGC
MCR1-R	CATTGGCGTGATGCCAGTTT
TET-A F	TTGGCATTCTGCATTCCTC
TET-A R	GTATAGCTTGCCGGAAGTCG
SUL1-F	TTTCCTGACCCTGCGCTCTAT
SUL1-R	GTGCGGACGTAGTCAGCGCCA

Fuente: (Poirel et al., 2011); (Calero-Cáceres, 2016).

g) Visualización de genes en el gel de Agarosa

Los productos de PCR fueron visualizados en gel de agarosa al 1%, teñido con SyberSafe, donde la presencia de una banda demuestra la amplificación de genes (Armstrong & Schulz, 2015).

A. Preparación del gel de agarosa

- ✓ Se añadió en un recipiente con tapa, 70 mL del tampón de electroforesis (TBE 1x) y 0,7 g de agarosa (1%).
- ✓ Se fundió la solución de agarosa en el microondas durante 2 minutos.
- ✓ Se dejó enfriar la solución hasta alcanzar unos 37°C.
- ✓ Se selló con cinta adhesiva la placa en donde se colocó el gel de agarosa.
- ✓ Una vez alcanzado los 37°C del gel de agarosa, se añadió 5 µl de SyberSafe, y se mezcló bien.
- ✓ Se vertió, la solución de agarosa con SyberSafe, en el soporte sellado anteriormente. Luego se colocó los peines, que nos sirvió para formar los pocillos del gel, y finalmente se dejó polimerizar durante 15 minutos (Armstrong & Schulz, 2015) .

B. Electroforesis

- ✓ Se retiró la cinta adhesiva con lo que se selló anteriormente el soporte del gel y se colocó en la cubeta de electroforesis. Los pocillos deben estar cerca del cátodo (polo negativo, color negro).
- ✓ Se añadió TBE 1x hasta que cubra bien el gel de agarosa.
- ✓ Se añadió 6 µl de Ladder (marcador de peso molecular 100 pb) en el primer pocillo.
- ✓ Luego se añadió 10 µl de la muestra preparada anteriormente en los siguientes pocillos, hasta completar todos los pocillos.
- ✓ Se tapó la cubeta de electroforesis y se procedió a conectar los electrodos a la fuente de alimentación.
- ✓ Se programó la fuente a unos 90 voltios, 400 mAh y se dejó correr la electroforesis durante 60 minutos.
- ✓ Una vez terminada la electroforesis, se visualizó los fragmentos de DNA mediante luz ultravioleta y se capturó una fotografía de la imagen. En la tabla 5 se muestran

los resultados esperados de amplificación de genes mediante PCR y electroforesis (Armstrong & Schulz, 2015).

Tabla 5. Amplificación de genes de resistencia mediante PCR.

Gen	Amplificación de genes	Ausencia de Amplificación
<i>bla_{IMP}</i>	+	-
<i>bla_{VIM}</i>	+	-
<i>bla_{OXA48}</i>	+	-
<i>bla_{NDM}</i>	+	-
<i>bla_{KPC}</i>	+	-
<i>mcr-1</i>	+	-
<i>tetA</i>	+	-
<i>sul1</i>	+	-

Fuente: (Poirel et al., 2011)

4.8 PROCESAMIENTO DE LA INFORMACION

Para el procesamiento de la información se utilizó el programa Microsoft Excel 2013.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS

Aislamiento e identificación de *Escherichia coli* en caninos

Para este estudio, participaron 148 caninos de diversa procedencia. Únicamente aquellos aislamientos que presentaron un perfil fenotípico de *E. coli* fueron criopreservados, almacenados en el banco de microorganismos y posteriormente evaluados por medio de técnicas de biología molecular. En el anexo 13 se detallan las características ampliadas de los aislados de los animales participantes, con información relevante con respecto a: raza, sexo, edad, historial clínico, registro histórico de tratamiento con antibióticos (de existir información), origen, así como el resumen de las pruebas bioquímicas y morfológicas estudiadas.

De un total de 148 muestras analizadas pertenecientes a caninos diagnosticados con o sin alteraciones clínicas remitidos a consulta, se encontró un total de 61/148 muestras de hisopado rectal positivas con patrón de resistencia a ceftriaxona 5 µg/ml, mismas que representan el 41.21% de muestras de esta procedencia analizadas (IC: 95%, 33–48). En relación al historial clínico, se observó diferencias en la frecuencia de detección de fenotipos de *E. coli* ceftriaxona resistente; en animales sin ninguna sintomatología o patología diagnosticada al momento (sanos), fueron aislados de 27 animales de un total de 68, representando el 39.70% (IC: 95%, 29-48); 16/40 animales mostraron enfermedades gastrointestinales, que representan el 40% (IC: 95%, 25-55); 7/11 pacientes acudieron con enfermedades de tipo respiratorio, que representan el 63.64 % de estos animales (IC: 95%, 37-91); 2/13 fueron diagnosticados con afecciones dermatológicas, que representan el 15.38% de perros con este tipo de enfermedades (IC: 95%, 4-34); 2/2 de ellos manifestaron enfermedades metabólicas, que representan el 100% de estas muestras (2/2; IC: 95%, 100); por último 7/14 pacientes acudieron a consulta con signos de intoxicación, politraumatismo, alteración genética, entre otras, que representan el 50% de este tipo de muestras (IC: 95%, 25-75).

Los porcentajes de aislamientos de *E. coli* con fenotipo de resistencia a ceftriaxona, y los intervalos de confianza al 95% de acuerdo al historial clínico se detallan en la tabla 6.

Tabla 6. Animales resistentes a ceftriaxona de acuerdo al historial clínico.

Historial clínico	# Muestras	<i>E. coli</i> Ceftriaxona resistente			
		# Positivos	% Positivos (Procedencia)	I.C. (95%)	% Positivos (TOTAL)
Sanos	68	27	39.7 %	29 % - 48 %	44
Enf. Gastrointestinales	40	16	40 %	25 % - 55 %	26
Enf. Respiratorias	11	7	63.6 %	37 % - 91 %	11
Enf. Dermatológicas	13	2	15.4 %	4 % - 34 %	3
Enf. Metabólicas	2	2	100 %	100 %	3
Otras	14	7	50 %	25 % - 75 %	11
Total	148	61	41.21	33 % - 48 %	100

Fuente: (Autor, 2018).

En la tabla 7 se detallan los porcentajes de aislamientos positivos de *E. coli* con fenotipo de resistencia a ceftriaxona (5 µg/ml) de acuerdo a la procedencia del animal. Se puede observar que el 44.8% (47/105; IC: 95%, 35-55) de caninos domésticos presenta *E. coli* resistente a ceftriaxona, así como el 32.6% (14/43; IC: 95%, 19-47) de caninos callejeros.

Tabla 7. Animales resistentes a ceftriaxona de acuerdo a su procedencia

Procedencia	# Muestras	<i>E. coli</i> Ceftriaxona resistente			
		# Positivos	% Positivos (Procedencia)	I.C. (95%)	% Positivos (TOTAL)
Domésticos	105	47	44.8 %	35 % - 55 %	77 %
Callejeros	43	14	32.6 %	19 % - 47 %	23 %
Total	148	61	41.2 %	33 % - 48 %	100 %

Fuente: (Autor, 2018).

Detección de la presencia de genes de resistencia a antibióticos emergentes por medio de PCR multiplex.

Para la ejecución de este estudio, realizamos una estandarización de la técnica de PCR multiplex de los primers y estándares. En la Figura 1. Se detallan los resultados obtenidos. El estudio determinó la presencia de los genes resistentes a carbapenemasas, mediante la confirmación de la amplificación específica del gen *bla*_{IMP}, con 232 bp, el gen *bla*_{OXA48}, con 438 bp, el gen *bla*_{VIM} con 390 bp, y el gen *bla*_{KPC} con 798 bp (Favier et al., 2010). Además de la amplificación del gen *bla*_{NDM} con 621 bp (Nordmann, Naas, & Poirel, 2011); y el gen *mcr-1* con 1126 bp (Ovejero, Delgado-Blas, Calero-Caceres, Muniesa, & Gonzalez-Zorn, 2017). Los estándares de los fragmentos a amplificar fueron suministrados por el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), y por la Universitat de Barcelona.

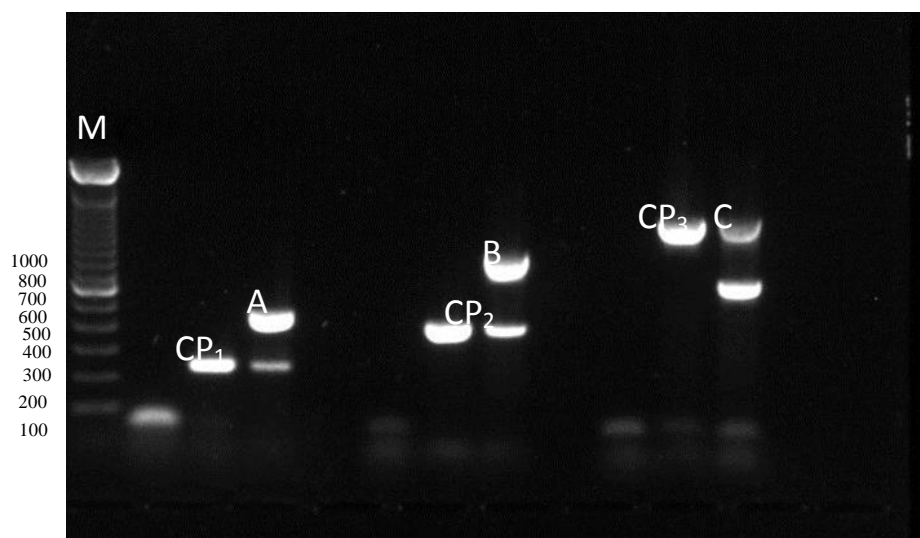


Figura 1. Estandarización de la técnica de PCR multiplex con primers y controles.

M: Marcador de peso molecular; **CP1:** control positivo *bla*_{IMP}; **A:** *bla*_{IMP} + *bla*_{OXA48}; **CP2:** control positivo *bla*_{VIM}; **B:** *bla*_{VIM} + *bla*_{KPC}; **CP3:** control positivo *mcr-1*. **C:** *bla*_{NDM} + *mcr-1*.

1.

Posteriormente, después de haber realizado las mPCR de las muestras compuestas y al tener amplificaciones positivas de cepas sospechosas, fueron realizadas PCR Singleplex de cada uno de los genes, para tener mejor especificidad en las amplificaciones definidas. En la figura 2, se puede observar las amplificaciones obtenidas con dicha técnica en muestras individuales para el gen *mcr-1*.

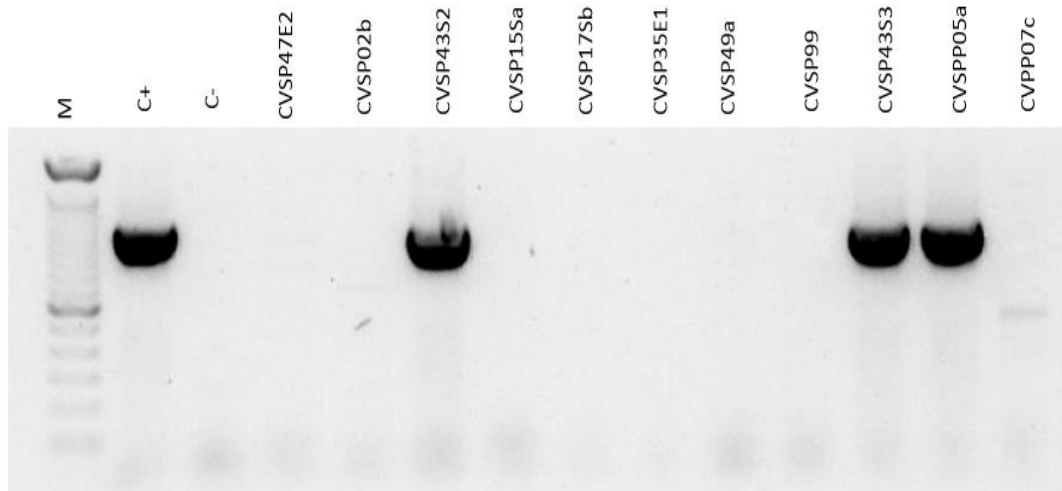


Figura 2. Amplificaciones positivas del Gen *mcr-1* mediante PCR Singleplex

M: Marcador de peso molecular; **C+:** control positivo, **C-:** Control negativo.

Tabla 8. Patrones genotípicos de genes de resistencia a antibióticos

Muestra	GENES DE RESISTENCIA						
	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{NDM}	<i>bla</i> _{IMP}	<i>bla</i> _{OXA-48}	<i>mcr-1</i>	<i>sul1</i>	<i>tetA</i>
CVSP02b1	-	-	-	-	-	+	+
CVSP02b2	-	-	-	-	-	+	+
CVSP04a	-	-	-	-	-	-	+
CVSP04b	-	-	-	-	-	-	+
CVSP05a	-	-	-	-	-	+	+
CVSP05b	-	-	-	-	-	+	-
CVSP08a	-	-	-	-	-	-	-
CVSP08b	-	-	-	-	-	-	-
CVSP12Sa	-	-	-	-	-	-	+
CVSP12Sb	-	-	-	-	-	-	-

Muestra	GENES DE RESISTENCIA						
	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{NDM}	<i>bla</i> _{IMP}	<i>bla</i> _{OXA-48}	<i>mcr-1</i>	<i>sul1</i>	<i>tetA</i>
CVSP12Sc2	-	-	-	-	-	-	-
CVSP15Sa	-	-	-	-	-	-	+
CVSP15Sb	-	-	-	-	-	-	+
CVSP17Sa	-	-	-	-	-	-	+
CVSP17Sb	-	-	-	-	-	-	+
CVSP18Ea	-	-	-	-	-	-	+
CVSP18Eb	-	-	-	-	-	-	+
CVSP26Sa	-	-	-	-	-	+	+
CVSP26Sb	-	-	-	-	-	+	-
C2a	-	-	-	-	-	+	+
C2b	-	-	-	-	-	+	+
C14a	-	-	-	-	-	-	-
C14b	-	-	-	-	-	-	-
CVSP33Ea	-	-	-	-	-	-	+
CVSP33Eb	-	-	-	-	-	-	-
CVSP35E1	-	-	-	-	-	+	+
CVSP37E1	-	-	-	-	-	-	+
CVSP37E2	-	-	-	-	-	-	+
CVSP39S	-	-	-	-	-	+	+
CVSP43S1	-	-	-	-	-	-	+
CVSP43S2	-	-	-	-	+	-	+
CVSP43S3	-	-	-	-	+	+	+
CVSP45E1a	-	-	-	-	-	-	+
CVSP45E1b	-	-	-	-	-	-	+
CVSP45E2	-	-	-	-	-	+	+
CVSP45E3	-	-	-	-	-	-	-
CVSP47E1	-	-	-	-	-	-	-
CVSP47E2	-	-	-	-	-	+	+
CVSP48E1	-	-	-	-	-	+	-
CVSP48E2	-	-	-	-	-	-	-

Muestra	GENES DE RESISTENCIA						
	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{NDM}	<i>bla</i> _{IMP}	<i>bla</i> _{OXA-48}	<i>mcr-1</i>	<i>sul1</i>	<i>tetA</i>
C17b	-	-	-	-	-	-	-
CVSP49a	-	-	-	-	-	-	+
CVSP52a	-	-	-	-	-	+	-
CVSP52b	-	-	-	-	-	+	-
CVSP57a	-	-	-	-	-	-	+
CVSP57b	-	-	-	-	-	-	-
C18a	-	-	-	-	-	+	-
C18b	-	-	-	-	-	+	-
C19a	-	-	-	-	-	-	-
C19b	-	-	-	-	-	-	-
C20a	-	-	-	-	-	-	+
C20b	-	-	-	-	-	-	+
C29a	-	-	-	-	-	-	-
C29b	-	-	-	-	-	-	-
C30a	-	-	-	-	-	+	-
C30b	-	-	-	-	-	+	-
CVSP60a	-	-	-	-	-	+	+
CVSP60b	-	-	-	-	-	+	-
CVSP61a	-	-	-	-	+	-	-
CVSP61b	-	-	-	-	-	-	-
CVSP62a	-	-	-	-	-	-	-
CVSP62b	-	-	-	-	-	-	+
CVSP68a	-	-	-	-	-	+	+
CVSP68b	-	-	-	-	-	+	+
CVSP69a	-	-	-	-	-	-	+
CVSP73a	-	-	-	-	+	-	+
CVSP73b	-	-	-	-	-	-	+
CVSP76a	-	-	-	-	-	-	-
CVSP76b	-	-	-	-	-	-	+
CVSP77a	-	-	-	-	+	+	+

Muestra	GENES DE RESISTENCIA						
	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{NDM}	<i>bla</i> _{IMP}	<i>bla</i> _{OXA-48}	<i>mcr-1</i>	<i>sul1</i>	<i>tetA</i>
CVSP79a	-	-	-	-	-	-	+
CVSP79b	-	-	-	-	-	-	-
CVPP02b	-	-	-	-	-	+	+
CVPP03a	-	-	-	-	-	+	+
CVPP03b	-	-	-	-	-	-	-
CVPP04a	-	-	-	-	-	-	-
CVPP04b	-	-	-	-	-	-	-
CVPP05a	-	-	-	-	+	-	+
CVPP05b	-	-	-	-	+	+	+
CVPP06	-	-	-	-	-	-	-
CVPP07a1	-	-	-	-	-	-	-
CVPP07a2	-	-	-	-	-	-	+
CVPP07b1	-	-	-	-	-	-	-
CVPP07b2	-	-	-	-	-	-	+
CVPP07c	-	-	-	-	-	-	+
CVPP08	-	-	-	-	-	-	-
CVSP81a	-	-	-	-	-	-	+
CVSP81b	-	-	-	-	-	-	+
CVSP83a	-	-	-	-	-	-	+
CVSP83b	-	-	-	-	-	-	-
C36	-	-	-	-	-	+	+
CVSP84	-	-	-	-	-	-	-
CVSP85	-	-	-	-	-	-	-
CVSP89	-	-	-	-	-	-	-
CVSP93	-	-	-	-	-	-	+
CVSP94	-	-	-	-	-	-	+
CVSP95a	-	-	-	-	-	-	-
CVSP95b	-	-	-	-	-	-	-
CVSP98a	-	-	-	-	-	-	+

Muestra	GENES DE RESISTENCIA						
	<i>bla_{KPC}</i>	<i>bla_{NDM}</i>	<i>bla_{IMP}</i>	<i>bla_{OXA-48}</i>	<i>mcr-1</i>	<i>sulI</i>	<i>tetA</i>
CVSP99	-	-	-	-	-	-	+
CVPP12b	-	-	-	-	-	+	-
CVSP100a	-	-	-	-	-	-	+
CVSP100b	-	-	-	-	-	-	+
C37	-	-	-	-	-	-	+

Fuente: (Autor, 2018).

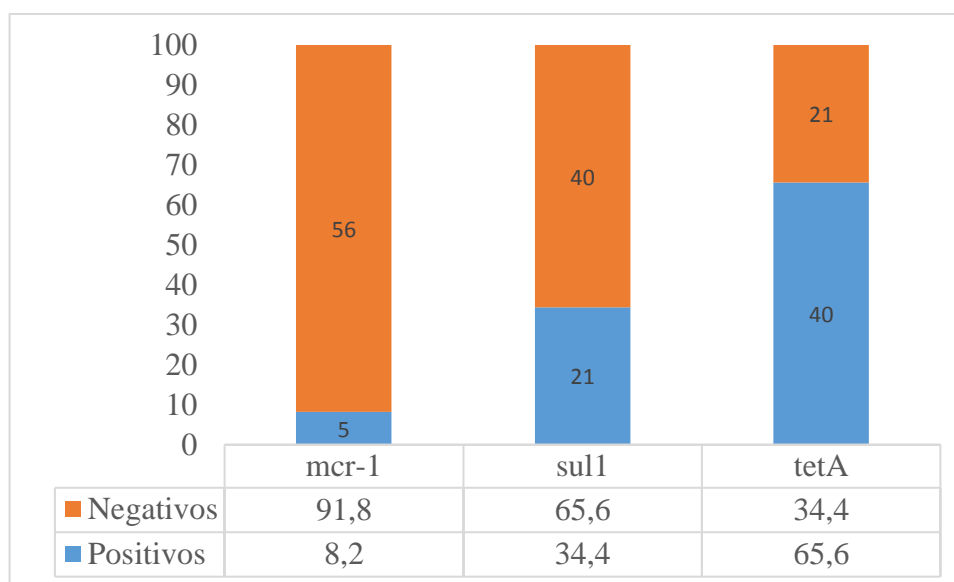
En la tabla 9, podemos observar que el 6.14% (7/114; IC: 95%, 1.7-10) de cepas de *E. coli* analizadas presentaron el gen de resistencia móvil a colistina *mcr-1*, En el 29.82% (34/114; IC: 95%, 21-37) de aislamientos analizados amplificaron el gen de resistencia a sulfonamida *sulI*, y el 55.26 % (63/114; IC: 95%, 46-64) de estas mismas cepas presentaron el gen de resistencia a tetraciclinas *tetA*.

Tabla 9. Animales positivos a los genes de resistencia.

Gen	# <i>E. coli</i> analizadas	# cepas positivas	# Animales Positivos	% Cepas Positivos por Gen	IC 95%	% Animales Positivos Total
<i>mcr-1</i>	114	7	5	6.14%	1.7 %– 10%	8.1%
<i>sulI</i>	114	34	21	29.82%	21% – 37%	34.4%
<i>tetA</i>	114	63	40	55.26%	46% - 64%	65.6%

Fuente: (Autor, 2018).

Gráfico 1. Animales positivos vs negativos resistentes al gen analizado.



En el gráfico 1, se detalla que el 8,2% (5/61) de caninos analizados son positivos al gen de resistencia móvil a colistina *mcr-1* y el 91,8% (56/61) son negativos, En el 34,4% (21/61) de caninos analizados son positivos al gen resistentes a sulfonamidas *sul1*, y el 65,6% (40/61) son negativos, finalmente el 65,6% (40/61) de caninos analizados son positivos al gen resistente a tetraciclinas *tetA* y el 34,4% (21/61) son negativos.

Tabla 10. Animales positivos a los genes de resistencia analizados de acuerdo a la procedencia.

Procedencia	# <i>E. coli</i> analizados	# <i>mcr-1</i>	IC 95%	# <i>tetA</i>	IC 95%	# <i>sul1</i>	IC 95%
<i>Callejeros</i>	26	2	2.3%-17.7%	12	27%-65%	9	17%-53%
<i>Domésticos</i>	88	5	0,8%-10.6%	51	48%-68%	25	19%-37%
<i>TOTAL</i>	114	7	1.7%-10%	63	46%-64%	34	21%-37%

Fuente: Autor, 2018.

Con respecto al origen de los animales muestreados, el 7.7 % (2/26; IC: 95%, 2.3-17.7) de cepas de *E. coli* analizadas procedentes de animales callejeros presentaron el gen de resistencia móvil a colistina *mcr-1*, en el 34.6% (9/26; IC: 95%, 17-53) de aislamientos analizados amplificaron el gen de resistencia a sulfonamida *sul1*, y el 46.2 % (12/26; IC: 95%, 27-65) de estas mismas cepas presentaron el gen de resistencia a tetraciclinas *tetA*. Por otro lado, el 5.7% (5/88; IC: 95%, 0.8-10%) de cepas de *E. coli* analizadas

pertenecientes a animales domésticos amplificaron el gen de resistencia móvil a colistina *mcr-1*, el 28,4% (25/88; IC: 95%, 19-37) presentaron el gen de resistencia a sulfonamida *sul1*, y el 57.9% (51/88; IC: 95%, 48-68) amplificaron el gen de resistencia a tetraciclinas *tetA*.

Los aislamientos de *E. coli* CVSP43S3, CVSP77a y CVPP05b presentan un perfil de multiresistencia, ya que en los mismos fueron detectados los genes *mcr-1*, *sul1* y *tetA*.

DISCUSIÓN

En los últimos años se ha observado una tasa de evolución alarmante de nuevos clones de microorganismos con mecanismos de resistencia avanzados, los cuales en combinación con una reducción significativa en el desarrollo de nuevos antibióticos, han originado un problema significativo de salud pública mundial (Minnesota Department of Health, 2017; P. Nordmann, 2014). Considerando la naturaleza global del problema, la Organización Mundial de la Salud recomienda el establecimiento de programas de vigilancia que monitoreen la diseminación, prevalencia y evolución de estos mecanismos (Reardon, 2014). Con estos antecedentes, se ha ejecutado la presente investigación, con la finalidad de realizar un monitoreo preliminar sobre la potencial diseminación de elementos genéticos que codifican genes de resistencia a antibióticos emergentes en animales de compañía de diversos orígenes en la ciudad de Ambato, cuya presencia es considerada crítica por varios organismos de control (Beloeil, Guerra, & Stoicescu, 2018; Centers for Disease Control and Prevention, 2017).

En el presente estudio, analizamos el porcentaje de caninos, tanto sanos como enfermos, de diversos orígenes (callejeros y domésticos) que presentan *E. coli* con fenotipos de resistencia a betalactámicos, utilizando una cefalosporina de tercera generación (Ceftriaxona 5µg/ml) como marcador para el aislamiento bacteriano, en donde el 41,21 % (61) de 148 animales muestreados de *E. coli* es resistente a ceftriaxona. Resultados similares fueron obtenidos en el estudio realizado por Espinoza, 2017, en donde el 32,97% (89) de *E. coli* aislada a partir de 270 muestras de caninos de la ciudad de Quito presentaron resistencia a β-lactámicos (Cefotaxima 3 µg/L). Como se puede observar en la tabla 6, existen notables diferencias en los porcentajes de *E. coli* positivos de acuerdo a su historial clínico, siendo las muestras procedentes de animales que presentaban enfermedades respiratorias y enfermedades metabólicas de cuales se aislaron el mayor porcentaje de *E. coli* ceftriaxona resistente. Un porcentaje similar de resistencia procedían de animales sanos (sin signos aparentes de enfermedad), con enfermedades gastrointestinales y otras patologías. La menor frecuencia de aislamiento de fenotipos resistentes a ceftriaxona provenía de animales de los cuales se aislaron *E. coli* con fenotipos de resistencia a ceftriaxona. Un porcentaje similar de fenotipos positivos correspondió a animales sanos (sin signos aparentes de enfermedad), enfermedades gastrointestinales y otras patologías. El porcentaje inferior de aislamientos resistentes a

este antibiótico correspondió a enfermedades dermatológicas. Así mismo, de acuerdo a la procedencia reciente del animal, se detectó un porcentaje superior de aislamientos positivos en animales domésticos (44.8 %; IC: 95%, 35-55) en comparación con los animales de procedencia callejera (32.6%, IC: 95%, 19-47). Una relación similar de resistencia fue observada en una investigación realizada en Corea entre 2006 y 2007, en donde detectaron un porcentaje del 3.9% de aislamientos de *E. coli*, procedentes de perros domésticos hospitalizados, que presentaron resistencia a una cefalosporina de tercera generación (cefotaxima 30 µg) en comparación con el 2.4% de aislamientos de animales callejeros que presentaban este fenotipo (Nam et al., 2010). Un porcentaje superior de fenotipos de resistencia a ceftriaxona fue detectado en Brasil, en donde un 21.4 % de *E. coli* aislada en perros domésticos presentó este fenotipo de resistencia (Carvalho et al., 2016). Hasta la fecha, la información relacionada a las diferencias en los perfiles fenotípicos de resistencia entre animales domésticos y de procedencia callejera es muy escasa en bibliografía. Se recomienda complementar este estudio por medio del análisis de los perfiles fenotípicos de resistencia a un panel de antibióticos a partir de los aislados de este estudio.

Los resultados obtenidos del porcentaje de animales que poseen el gen móvil resistente a colistina (descubierto en el año 2015), denominado *mcr-1*, fue del 6.14% (IC: 95%, 1.7-10), con 5 perros reactivos positivos de los 148 muestreados. Este porcentaje de positivos guarda relación con el reportado por Zhang et al., (2016) en China, el cual detectó un 11% de animales positivos al gen *mcr-1*, con 6 animales de los 53 muestreados, 4 pertenecientes a perros y dos pertenecientes a gatos. Además, cabe mencionar que estos aislamientos de *E. coli* estuvieron asociados a pacientes humanos, lo cual sugiere que la presencia de bacterias con estos elementos genéticos tiene el potencial de transmitirse a diferentes especies que comparten el mismo ecosistema. Además, concuerda con el estudio realizado por Lei et al., (2017), quienes detectaron la presencia de fenotipos de resistencia a colistina en el 8.7 % (49/566) de enterobacterias aisladas en animales de compañía (*E. coli*, *Klebsiella spp*, *Shigella spp.*, *Enterobacter spp.*); de las cuales, el 62% (49/79) de los aislamientos contenían el gen *mcr-1*. La presencia del gen *mcr-1* representa una alarma desde el punto de vista epidemiológico y zoonótico, ya que existe una demostrada posibilidad de transmisión de vectores animales al ser humano; tal como reportan estudios relacionados alrededor del mundo (Delgado-blas et al., 2016; Haenni et al., 2016).

En relación al historial clínico detallado de los perros portadores de *E. coli mcr-1* positivos, los 7 aislamientos positivos proceden de 5 perros con cuadros clínicos diversos: 2 animales sanos (Poodle hembra, 2 meses; mestizo macho, 8 años, uso de antibióticos previo desconocido), 1 animal diagnosticado con gastroenteritis por parvovirus (Schnautzer hembra, 6 meses, uso de antibióticos previo desconocido), 1 animal con diagnóstico de Distemper canino (Cocker Spaniel, 6 meses, uso de antibióticos previo desconocido) y de 1 animal diagnosticado con osteoartritis (Poodle hembra, 10 años, historial de uso de antibióticos: betalactámicos, sulfonamidas y macrólidos). Como se puede apreciar, no existe una relación directa entre los historiales clínicos de los pacientes y la probabilidad de encontrar *E. coli mcr-1* positivas. Es probable que la diseminación y manifestación de este genotipo dependa de factores ambientales; Por ejemplo, Lei et al., (2017) sugiere que el gen *mcr-1* pudieron encontrarse en el alimento balanceado utilizado como alimento de los animales, y que pudo transferirse mediante transferencia genética horizontal a la microbiota de los animales. Se recomienda a futuro encontrar evidencias que relacionen su presencia y adicionalmente, detectar reservorios que permitan elucidar las rutas de transmisión de los mismos.

Con relación a la procedencia detallada de los perros portadores de *E. coli mcr-1* positivos, el 7,7% (2/26; IC: 95%, 2.3-17.7) de aislamientos positivos proceden de un animal callejero (Poodle hembra, 2 meses, uso de antibióticos previo desconocido) sin ninguna patología diagnosticada, y el 5,7% (5/26; IC: 95%, 0.8-10) de aislamientos positivos provienen de 4 animales domésticos (mestizo macho, 8 años, uso de antibióticos previo desconocido; Schnautzer hembra, 6 meses, uso de antibióticos previo desconocido; Cocker Spaniel, 6 meses, uso de antibióticos previo desconocido; Poodle hembra, 10 años, historial de uso de antibióticos: betalactámicos, sulfonamidas y macrólidos).

En las muestras de *E. coli* analizadas, no fueron detectados genes que codifican producción de carbapenemasas. Sin embargo, considerando su constante diseminación global, se recomienda realizar estudios relacionados a futuro, ya que se ha observado que los mecanismos de resistencia se diseminan y evolucionan de manera temporal (One Health ministerial conference, 2016).

Además se determinó la presencia de los genes resistentes a sulfonamidas (*sulI*) y tetraciclinas (*tetA*); obteniendo un porcentaje de 29.82% (IC: 95%, 21-37) de animales que portan *E. coli* positivos al gen *sulI*, y el 55.26 % (IC: 95%, 46-64) de animales

portadores de *E. coli* los cuales amplificaron el gen *tetA*. Los resultados detectados guardan relación con los genotipos detectados en otros países, como por ejemplo un estudio realizado en Brasil durante 2008, en donde detectaron el gen *tetA* en el 62.5 % (10/16) de aislados de *E. coli* con fenotipos de resistencia a tetraciclinas (Costa et al., 2008). Un estudio realizado en un hospital veterinario de Reino Unido en el 2017, detectó una elevada prevalencia del gen *tetA* en los aislados de *E. coli* de caninos, con una prevalencia del 76.6% (23/30); así como del gen *sulI*, con el 80 % (24/30) de positivos (Wedley et al., 2017). Por lo expuesto, estos genes presentan una elevada diseminación en aislamientos de *E. coli* caninos alrededor del mundo.

Finalmente se determinó la relación existente de resistencia a sulfonamidas y tetraciclinas con respecto a la procedencia detallada en la tabla 10, en animales domésticos se obtuvo el 28,4% (25/88; IC: 95%, 19-37) presentaron el gen de resistencia a sulfonamida *sulI*, y el 57.9% (51/88; IC: 95%, 48-68) amplificaron el gen de resistencia a tetraciclinas *tetA*. Con respecto a los animales callejeros el 34.6% (9/26; IC: 95%, 17-53) de aislamientos analizados amplificaron el gen de resistencia a sulfonamida *sulI*, y el 46.2 % (12/26; IC: 95%, 27-65) de estas mismas cepas presentaron el gen de resistencia a tetraciclinas *tetA*.

En los aislados de *E. coli* CVSP43S3, CVSP77a, CVPP05b fueron detectados los genes de resistencia *mcr-1*, *sulI* y *tetA*, presentando un potencial patrón de multiresistencia. Con respecto al origen, el primer aislamiento procede de un animal callejero (Poodle hembra, 2 meses, diagnóstico: sano), el segundo obtenido a partir de un animal doméstico (Mestizo macho, 8 años, diagnóstico: sano), de la misma forma, el tercer aislamiento procedió de un animal doméstico (Cocker spaniel hembra, 6 meses, diagnóstico: Distemper canino). Por lo observado, se deduce que los animales sanos pueden actuar como un reservorio potencial de microorganismos portadores de genes de resistencia a antibióticos emergentes. Es necesario complementar la presente investigación, con la finalidad de detectar las vías de diseminación de los clones portadores del gen *mcr-1*, y evaluar si existe algún tipo de relación clonal entre aislamientos clínicos y veterinarios portadores de este gen y los aislados obtenidos en el presente estudio.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFIA Y ANEXOS

CONCLUSIONES

- ✓ Se aislaron 114 cepas de *E. coli* resistentes a Ceftriaxona, procedentes de 61 caninos sanos como enfermos, procedentes de la ciudad de Ambato, las mismas que fueron confirmadas por medio de ensayos bioquímicos y morfológicos y depositadas en el banco de microorganismos del Laboratorio de Microbiología Agrícola y Ambiental de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, para futuras investigaciones.
- ✓ Se detectó la presencia de genes de resistencia a antibióticos emergentes en los aislados de *E. coli* aisladas en caninos de la ciudad de Ambato, mediante la técnica de PCR multiplex, detectando un porcentaje del 6.14% (IC: 95%, 1.7-10) de cepas que amplifican el gen *mcr-1*. No se detectaron aislamientos positivos a los genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{VIM}*. Adicionalmente, el 29.82% (IC: 95%, 21-37) presenta el gen *sulI*, y el 55.26 (IC: 95%, 46-64) dispone del gen de resistencia a tetraciclinas *tetA*.
- ✓ Se evaluó, la diferencia de perfiles de resistencia a Ceftriaxona en animales domésticos y callejeros, obteniendo un 44.8% (IC: 95%, 35-55) de 105 caninos domésticos muestreados y 32.6 (IC: 95%, 19-47) de 43 caninos callejeros, determinando que los animales callejeros muestran un menor porcentaje de resistencia a ceftriaxona, por lo que se podría sospechar que los animales domésticos tienen mayor resistencia, debido a que son sometidos a gran variedad de antibióticos que han recibido anteriormente.
- ✓ Con respecto a los genotipos de resistencia de *E. coli* de los animales evaluados, se determinó que el 7.7 % (2/26; IC: 95%, 2.3-17.7) de cepas procedentes de animales callejeros presentaron el gen de resistencia móvil a colistina *mcr-1*, el 34.6% (9/26; IC: 95%, 17-53) de aislamientos analizados amplificaron el gen de resistencia a sulfonamida *sulI*, y el 46.2 % (12/26; IC: 95%, 27-65) de estas mismas cepas presentaron el gen de resistencia a tetraciclinas *tetA*. En comparación con animales domésticos, el 5.7% (5/88; IC: 95%, 0.8-10) de cepas

de *E. coli* analizadas pertenecientes a animales domésticos amplificaron el gen de resistencia móvil a colistina *mcr-1*, el 28,4% (25/88; IC: 95%, 19-37) presentaron el gen de resistencia a sulfonamida *sul1*, y el 57.9% (51/88; IC: 95%, 48-68) amplificaron el gen de resistencia a tetraciclinas *tetA*.

- ✓ Las diferencias en los genotipos de resistencia a antibióticos observadas son notables. Este estudio representa la primera parte de una investigación que plantea determinar los perfiles de resistencia fenotípica y genotípica de los aislados de *E. coli* circundantes en caninos de la ciudad de Ambato. Las cepas positivas al gen *mcr-1* serán secuenciadas por medio de *New Generation Sequencing*, con la finalidad de conocer si poseen relaciones clonales con bacterias detectadas en el sector de salud pública, así como para conocer acerca de sus mecanismos de virulencia y otros genotipos de resistencia a antibióticos que no fueron evaluados en el panel de esta tesis.

BIBLIOGRAFIA

- Alicia Padilla Peña, C., Diez Dapena, J., Martínez Galisteo, E., Antonio Bárcena Ruiz, J., & García Alfonso, C. (2010). 7.-Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico. Recuperado a partir de https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/17ELECTROFORESIS_ACS_NUCLEICOS_GELES_AGAROSA.pdf
- Armstrong, J. A., & Schulz, J. R. (2015). Agarose gel electrophoresis. *Current Protocols in Essential Laboratory Techniques*, 2015, 7.2.1-7.2.22. <https://doi.org/10.1002/9780470089941.et0702s10>
- Ashwood-Smith, M. J. (1985). Genetic damage is not produced by normal cryopreservation procedures involving either glycerol or dimethyl sulfoxide: A cautionary note, however, on possible effects of dimethyl sulfoxide. *Cryobiology*, 22(5), 427-433. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(85\)90153-1](https://doi.org/10.1016/0011-2240(85)90153-1)
- Bachmeier, K. L., Williams, A. E., Warmington, J. R., & Bang, S. S. (2002). Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation. *Journal of Biotechnology*, 93(2), 171-181. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00393-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00393-5)
- Becton Dickinson BD. (2013). EMB Agar (Eosin Methylene Blue Agar), Modified. *Instituciones de uso-Medio en placas listo para su uso*, (April), 2-4. Recuperado a partir de <https://www.bd.com/resource.aspx%3FIDX%3D8765>
- Beloel, P., Guerra, B., & Stoicescu, A. (2018). Manual for reporting on antimicrobial resistance within the framework of Directive 2003/99/EC and Decision 2013/652/EU for information derived from the year 2017. *EFSA Supporting Publications*, 15(1). <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2018.EN-1369>
- Benavides-Plascencia, L., Aldama-Ojeda, A. L., & Vázquez, H. J. (2005). Vigilancia de los niveles de uso de antibióticos y perfiles de resistencia bacteriana en hospitales de tercer nivel de la Ciudad de México. *Salud Publica de Mexico*, 47(3), 219-226. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342005000300005>
- Bentancor, A. (2006). El rol epidemiológico de las mascotas en el ciclo de transmisión urbana de cepas STEC. *Medicina*, 66(SUPPL. 3), 37-41. Recuperado a partir de <http://medicinabuenosaires.com/revistas/vol66-06/Supl-3/v66-s3-37-41.pdf>
- Caniaux, I., van Belkum, A., Zambardi, G., Poirel, L., & Gros, M. F. (2017). MCR: modern colistin resistance. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2846-y>

- Carvalho, A. C., Barbosa, A. V., Arais, L. R., Ribeiro, P. F., Carneiro, V. C., & Cerqueira, A. M. F. (2016). Resistance patterns, ESBL genes, and genetic relatedness of *Escherichia coli* from dogs and owners. *Brazilian Journal of Microbiology*, *47*(1), 150-158. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.005>
- Catry, B., Cavaleri, M., Baptiste, K., Grave, K., Grein, K., Holm, A., ... Edo, J. T. (2015). Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *46*(3), 297-306. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.06.005>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2017). Emerging Drug Resistance | Antibiotic/Antimicrobial Resistance | CDC.
- Costa, Poeta Sáenz, Coelho, Matos, Vinué, R. & T. (2008). Prevalence of antimicrobial resistance and resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pets. *Veterinary Microbiology*, *127*(1-2), 97-105. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2007.08.004>
- Costa, D., Poeta, P., Sáenz, Y., Coelho, A. C., Matos, M., Vinué, L., ... Torres, C. (2008). Prevalence of antimicrobial resistance and resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pets. *Veterinary Microbiology*, *127*(1-2), 97-105. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.08.004>
- De Tema, R., Máttar, S., & Martínez, P. (2007). Emergencia de la resistencia antibiótica debida a las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE): detección, impacto clínico y epidemiología. Recuperado a partir de <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v11n1/v11n1a05.pdf>
- Delgado-blas, J. F., Ovejero, C. M., Abadia-patiño, L., & Gonzalez-zorn, B. (2016). Coexistence of mcr-1 and bla NDM-1 in *Escherichia coli* from Venezuela. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *60*(10), 6356-6358. <https://doi.org/10.1128/AAC.01319-16.Address>
- Dolejska, M., Duskova, E., Rybarikova, J., Janoszowska, D., Roubalova, E., Dibdakova, K., ... Cizek, A. (2011). Plasmids carrying blaCTX-M-1 and qnr genes in *Escherichia coli* isolates from an equine clinic and a horseback riding centre. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *66*(4), 757-764. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq500>
- El Salabi, A., Walsh, T. R., & Chouchani, C. (2012). Extended spectrum β -lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance

- in Gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(January 2012), 1-10. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.691870>
- Espinoza, E. (2017). Aislamiento e identificación de cepas de *Escherichia coli* resistentes a Betalactámicos de espectro extendido mediante aislamiento bacteriano de caninos en la zona urbana de Quito, 60. Recuperado a partir de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/10149/1/T-UCE-0018-005-2017.pdf>
- F. L. Pantozzi, F. A. Moredo, G. B. Vigo, G. I. G. (2010). Resistencia a los antimicrobianos en bacterias indicadoras y zoonóticas aisladas de animales domésticos en Argentina. *Revista argentina de microbiología*, 42(1). Recuperado a partir de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412010000100011
- Falgenhauer, L., Waezsada, S.-E., Gwozdziński, K., Ghosh, H., Doijad, S., Bunk, B., ... Chakraborty, T. (2016). Chromosomal Locations of *mcr-1* and *bla* CTX-M-15 in Fluoroquinolone-Resistant *Escherichia coli* ST410. *Emerging infectious diseases*, 22(9), 1689-91. <https://doi.org/10.3201/eid2209.160692>
- Favier, C., Arlet, G., Dallenne, C., Costa, A. Da, Decré, D., & Curie, M. (2010). Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae 1,2, (January), 490-495. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp498>
- Fernández, D; Etcheverría, A. I.; Padola, N. L. ; Parma, A. E. (1999). Estudio en caninos de zonas urbanas de Tandil como posibles portadores de *Escherichia coli* verocitotoxigénicos. *InVet*, 8(1), 111-117. Recuperado a partir de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1668-34982006000100010
- Fischer, J., Rodriguez, I., Schmoger, S., Friese, A., Roesler, U., Helmuth, R., & Guerra, B. (2012). *Escherichia coli* producing VIM-1 carbapenemase isolated on a pig farm. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(7), 1793-1795. <https://doi.org/10.1093/jac/dks108>
- González-Torralba, A., Oteo, J., Asenjo, A., Bautista, V., Fuentes, E., & Alós, J.-I. (2016). Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Companion Dogs in Madrid, Spain. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(4), 2499-501. <https://doi.org/10.1128/AAC.02383-15>

- Gullberg, E., Albrecht, L. M., Karlsson, C., Sandegren, L., & Andersson, D. I. (2014). Selection of a multidrug resistance plasmid by sublethal levels of antibiotics and heavy metals. *mBio*, 5(5), e01918-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01918-14>
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O. G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., & Andersson, D. I. (2011). Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS pathogens*, 7(7), e1002158. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002158>
- Haenni, M., Poirel, L., Kieffer, N., Châtre, P., Saras, E., Métayer, V., ... Madec, J. Y. (2016). Co-occurrence of extended spectrum β lactamase and MCR-1 encoding genes on plasmids. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(3), 281-282. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00007-4)
- Johnson, A. P., & Woodford, N. (2013). Global spread of antibiotic resistance: The example of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 62(PART4), 499-513. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.052555-0>
- Laboratorios Britania. (2012). T.S.I. Agar (Triple Sugar Iron Agar). *American Society for Microbiology Microbe Library*, 1(September 2005), 1-2. Recuperado a partir de <http://www.britanialab.com/productos/B02134> REV 01-TSI AGAR.pdf%5Cn<http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/2842-triple-sugar-iron-agar-protocols>
- Lei, L., Wang, Y., Schwarz, S., Walsh, T. R., Ou, Y., Wu, Y., & Li, M. (2017). from Companion Animals, Beijing, China, 2012–2016, 23(4), 710-711. <https://doi.org/10.3201/eid2304.161732>
- Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., ... Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2), 161-168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
- Macwilliams, M. P. (2013). Indole Test Protocol. *American Society of Microbiology*, (April), 2-6. Recuperado a partir de <http://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.3202>
- MacWilliams, M. P. (2012). Citrate Test Protocol. *American Society for Microbiology, MicrobeLibrary*, (December 2009), 4-7. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

- Minnesota Department of Health. (2017). About Antibiotic Resistance and One Health: One Health Antibiotic Stewardship Collaborative.
- Nam, H.-M., Lee, H.-S., Byun, J.-W., Yoon, S.-S., Jung, S.-C., Joo, Y.-S., & Lim, S.-K. (2010). Prevalence of Antimicrobial Resistance in Fecal *Escherichia coli* Isolates from Stray Pet Dogs and Hospitalized Pet Dogs in Korea. *Microbial Drug Resistance*, *16*(1), 75-79. <https://doi.org/10.1089/mdr.2009.0125>
- Néstor Javier Pavón-Gómez. (2013). Diagnóstico y tratamiento de infección de las vías urinarias en embarazadas que acuden a Emergencia y consulta externa del Hospital Bertha Calderón Roque en Managua, Nicaragua. *Perinatología y reproducción humana*, *27*(1), 15-20. Recuperado a partir de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-53372013000100003
- Nordmann, P. (2014). Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Overview of a major public health challenge. *Medecine et Maladies Infectieuses*, *44*(2), 51-56. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2013.11.007>
- Nordmann, P., Naas, T., & Poirel, L. (2011). Global spread of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*, *17*(10), 1791-1798. <https://doi.org/10.3201/eid1710.110655>
- One Health ministerial conference. (2016). Antimicrobial Resistance, from intentions to action! En *AMR Next*. Dutch Ministry of Health Welfare and Sport and the Dutch Ministry of Agriculture.
- Ortega-Paredes, D., Barba, P., & Zurita, J. (2016). Colistin-resistant *Escherichia coli* clinical isolate harbouring the *mcr-1* gene in Ecuador. *Epidemiology and Infection*, *144*(14), 2967-2970. <https://doi.org/10.1017/S0950268816001369>
- Ovejero, C. M., Delgado-Blas, J. F., Calero-Caceres, W., Muniesa, M., & Gonzalez-Zorn, B. (2017). Spread of *mcr-1* -carrying Enterobacteriaceae in sewage water from Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, (January), dkw533. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw533>
- Paterson, D. L., & Harris, P. N. A. (2016). Colistin resistance: A major breach in our last line of defence. *The Lancet Infectious Diseases*, *16*(2), 132-133. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00463-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00463-6)
- Paz Rojas, E., Ponce de León Pandolfi, D., & Ramírez, R. (1972). Resistencia bacteriana en cuidados intensivos y tendencia actual: Departamento de Cuidados Críticos,

- Servicio de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, Essalud, Lima, Perú, 2004-2006. *Acta Médica Peruana*, 25(3), 140-147. Recuperado a partir de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172008000300004
- Piedra-Carrasco, N., Fàbrega, A., Calero-Cáceres, W., Cornejo-Sánchez, T., Brown-Jaque, M., Mir-Cros, A., ... González-López, J. J. (2017). Carbapenemase-producing enterobacteriaceae recovered from a Spanish river ecosystem. *Plos One*, 12(4), e0175246. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175246>
- Queenan, A. M., & Bush, K. (2007). Carbapenemases: The versatile β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3), 440-458. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-07>
- Queenan, K., Hasler, B., & Rushton, J. (2016). A One Health approach to antimicrobial resistance surveillance: is there a business case for it? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 48(4), 422-427. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.06.014>
- Reardon, S. (2014). WHO warns against «post-antibiotic» era. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature.2014.15135>
- Rossolini, G. M. (2015). Extensively drug-resistant carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: An emerging challenge for clinicians and healthcare systems. *Journal of Internal Medicine*, 277(5), 528-531. <https://doi.org/10.1111/joim.12350>
- Sandegren, L. (2014). Selection of antibiotic resistance at very low antibiotic concentrations. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 119(2), 103-7. <https://doi.org/10.3109/03009734.2014.904457>
- Sekirov, I., Croxen, M. A., Ng, C., Azana, R., Chang, Y., Mataseje, L., ... Hoang, L. M. N. (2016). Epidemiologic and genotypic review of carbapenemase-producing organisms in British Columbia, Canada, between 2008 and 2014. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(2), 317-327. <https://doi.org/10.1128/JCM.02289-15>
- Shaheen, B. W., Nayak, R., & Boothe, D. M. (2013). Emergence of a New Delhi metallo- β -Lactamase (NDM-1)-encoding gene in clinical Escherichia coli isolates recovered from companion animals in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(6), 2902-2903. <https://doi.org/10.1128/AAC.02028-12>
- Skov, R. L., & Monnet, D. L. (2016). Months Later , the Story Unfolds. *Euro Surveill.*

21(9), 1-6.

- Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., & Holt, J. G. (1986). *Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 2. Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 2.* Williams & Wilkins. Recuperado a partir de <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19872040344>
- Stolle, I., Prenger-Berninghoff, E., Stamm, I., Scheufen, S., Hassdenteufel, E., Guenther, S., ... Ewers, C. (2013). Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in dogs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(12), 2802-2808. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt259>
- Suarez, C. J., Kattán, J. N., Guzmán, A. M., & Villegas, M. V. (2006). Mecanismos de resistencia *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. *Infectio*, 10(2), 85-93.
- Tamang, M. D., Nam, H. M., Jang, G. C., Kim, S. R., Chae, M. H., Jung, S. C., ... Lim, S. K. (2012). Molecular characterization of extended-spectrum- β -lactamase-producing and plasmid-mediated AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from stray dogs in South Korea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(5), 2705-2712. <https://doi.org/10.1128/AAC.05598-11>
- Tsai, H.-J., Huang, H.-C., Lin, C.-M., Lien, Y.-Y., & Chou, C.-H. (2007). Salmonellae and Campylobacters in Household and Stray Dogs in Northern Taiwan. *Veterinary Research Communications*, 31(8), 931-939. <https://doi.org/10.1007/s11259-007-0009-4>
- Wagner, S., Gally, D. L., & Argyle, S. A. (2014). Multidrug-resistant *Escherichia coli* from canine urinary tract infections tend to have commensal phylotypes, lower prevalence of virulence determinants and ampC-replicons. *Veterinary microbiology*, 169(3-4), 171-8. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.01.003>
- Wedley, A. L., Dawson, S., Maddox, T. W., Coyne, K. P., Pinchbeck, G. L., Clegg, P., Williams, N. J. (2017). Carriage of antimicrobial resistant *Escherichia coli* in dogs: Prevalence, associated risk factors and molecular characteristics. *Veterinary Microbiology*, 199, 23-30. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.11.017>
- Willey, J. M., Sherwood, L., Woolverton, C. J., & Prescott, L. M. (2017). *Prescott's microbiology*.
- Woodford, N., Turton, J. F., & Livermore, D. M. (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance.

- FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 736-755. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x>
- World Health Organization. (2015). *Global Action Plan on Antimicrobial Resistance*. World Health Organization. Recuperado a partir de <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/en/>
- World Health Organization. (2017). Antimicrobial Resistance. *World Health Organization Regional Office for Europe*, 298(15), 1803-1804. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.11764>
- Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., & Walsh, T. R. (2009). Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(12), 5046-5054. <https://doi.org/10.1128/AAC.00774-09>
- Zhang, X., Doi, Y., Huang, X., & Li, H. (2016). Possible Transmission of mcr-1 – Harboring *Escherichia coli* between Companion Animals and Human Article in *Emerging infectious diseases* · September 2016, 22(August), 2015-2017. <https://doi.org/10.3201/eid2209.160464>
- Zhi, C., Lv, L., Yu, L. F., Doi, Y., & Liu, J. H. (2016). Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(3), 292-293. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00063-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00063-3)

ANEXOS

Anexo 1. Toma de muestras.

Hisopado Rectal



Almacenamiento y transporte de muestras



Anexo 2. Aislamiento bacteriano

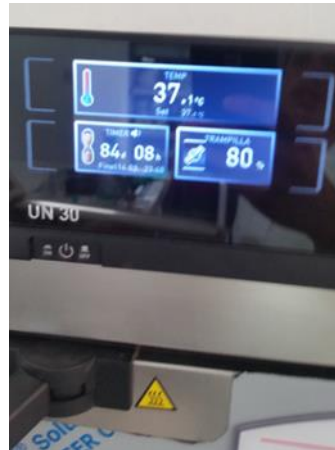
Homogenización de muestras con medio PBS



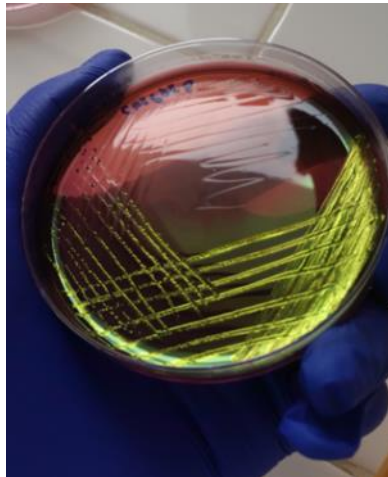
Siembra en Agar Levine



Incubación durante 24 horas



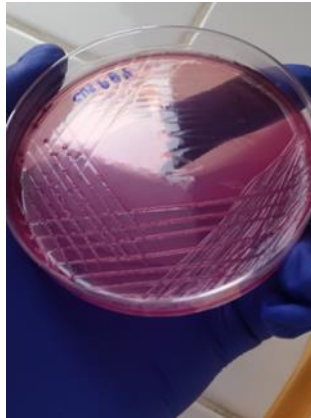
Colonias Positivas en Agar Levine



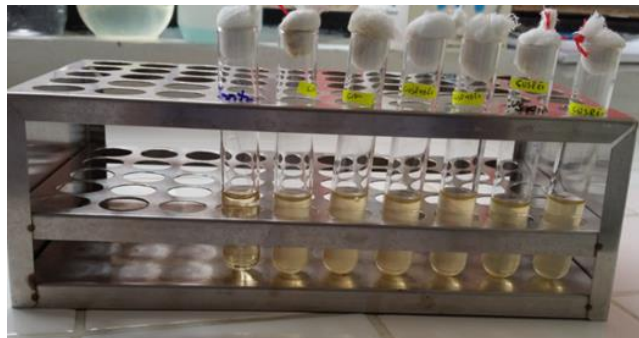
Siembra en Agar MacConkey



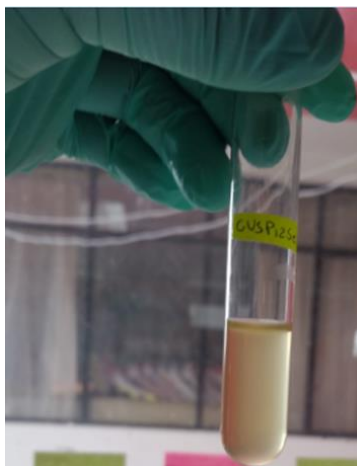
Colonias positivas en Agar MacConkey



Aislamiento Bacteriano en Agua Peptonada más Ceftriaxona



Cultivo Positivo en Agua Peptonada

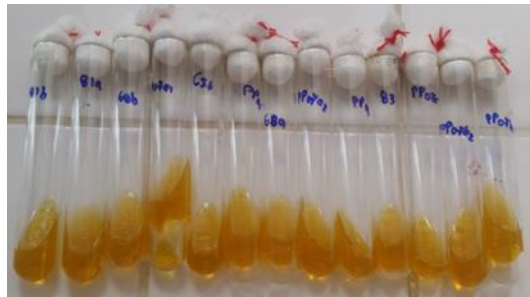


Criopreservación de colonias positivas

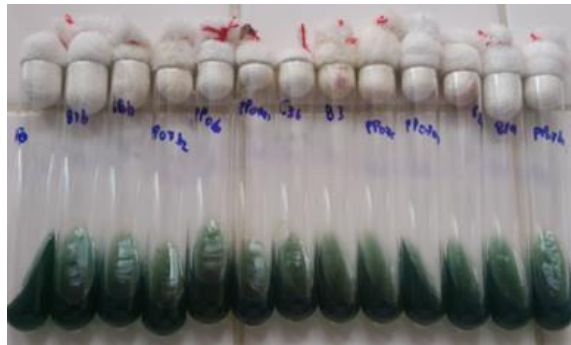


Anexo 3. Pruebas Bioquímicas.

Prueba TSI Acido/Acido con producción de gas



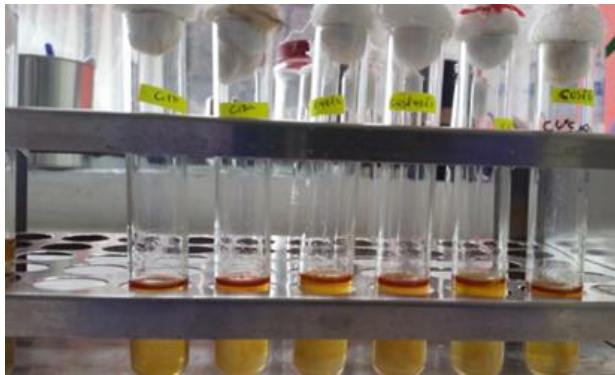
Prueba Citrato Negativo



Prueba Ureasa Negativa



Prueba Indol Positivo



Anexo 4. Banco de cepas bacterianas.



Anexo 5. Lisis Bacteriana.

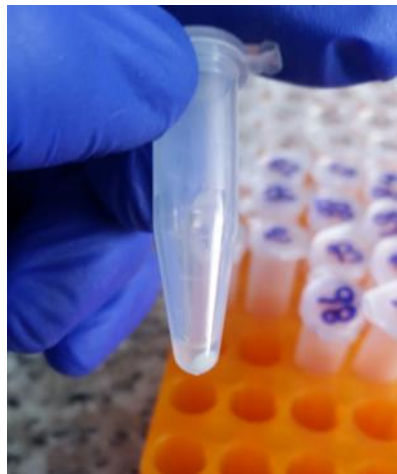
Centrifugado de Muestras



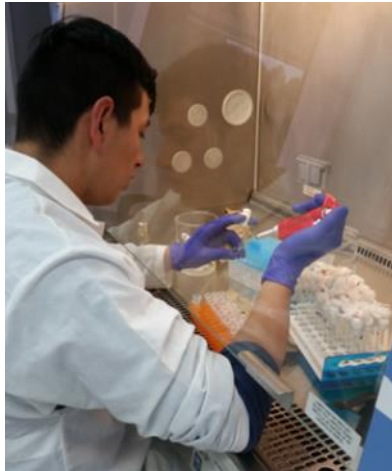
Eliminar Sobrenadante



Pellet en el fondo del tubo



Agregación de Agua Destilada Estéril



Baño María 90 °C



Choque Térmico

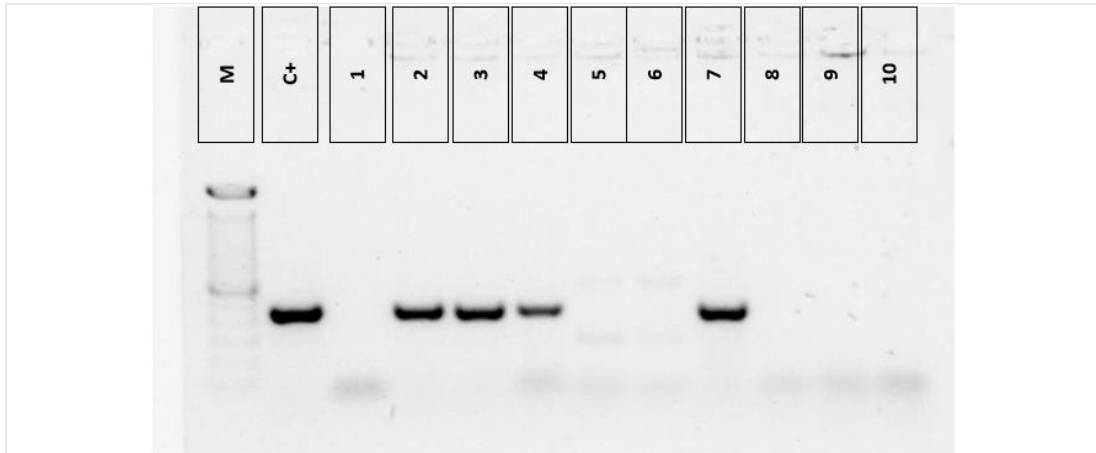


Anexo 6. PCR Muestras Compuestas (*bla_{VIM}* y *bla_{KPC}*).



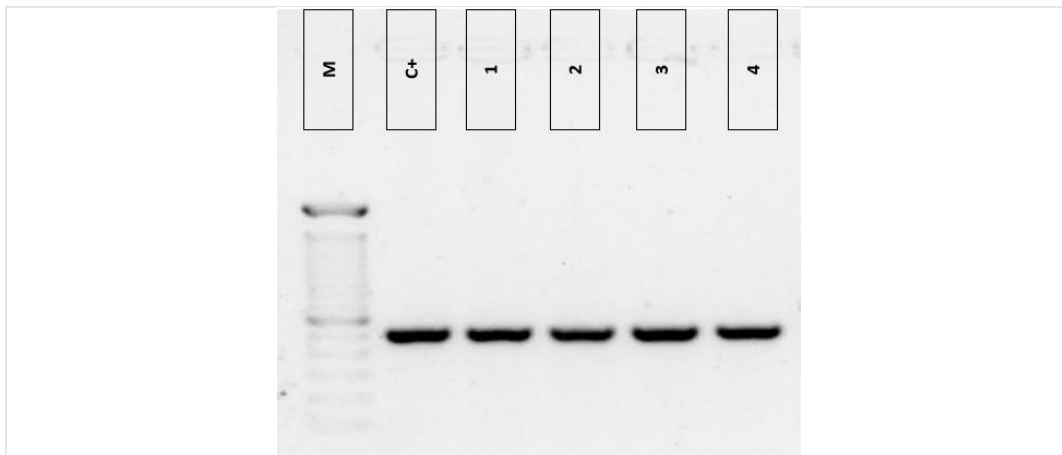
M: marcador de peso molecular; **C-:** control negativo; **C+:** control positivo (*bla_{VIM}* + *bla_{KPC}*); **A:** (CVSP02b1, CVSP02b2, CVSP05a); **B:** (CVSP04a, CVSP15Sa, CVSP17S); **C:** (CVSP18Ea, CVSP26Sa, CVSP33Ea); **D:** (CVSP35E1, CVSP39S, CVSP43S1); **E:** (C2a, C2b, C2c); **F:** (CVPP07c, CVSP49a, CVSP57b); **G:** (CVSP100a, CVSP100b, CVSP69a), **H:** (CVSP98a, CVSP62b, CVPP03a), **I:** (CVPP5b, C20a, CVSP79a); **J:** (CVSP77b, CVSP81a, C36).

Anexo 7. PCR Muestras Individuales (*SulI*)



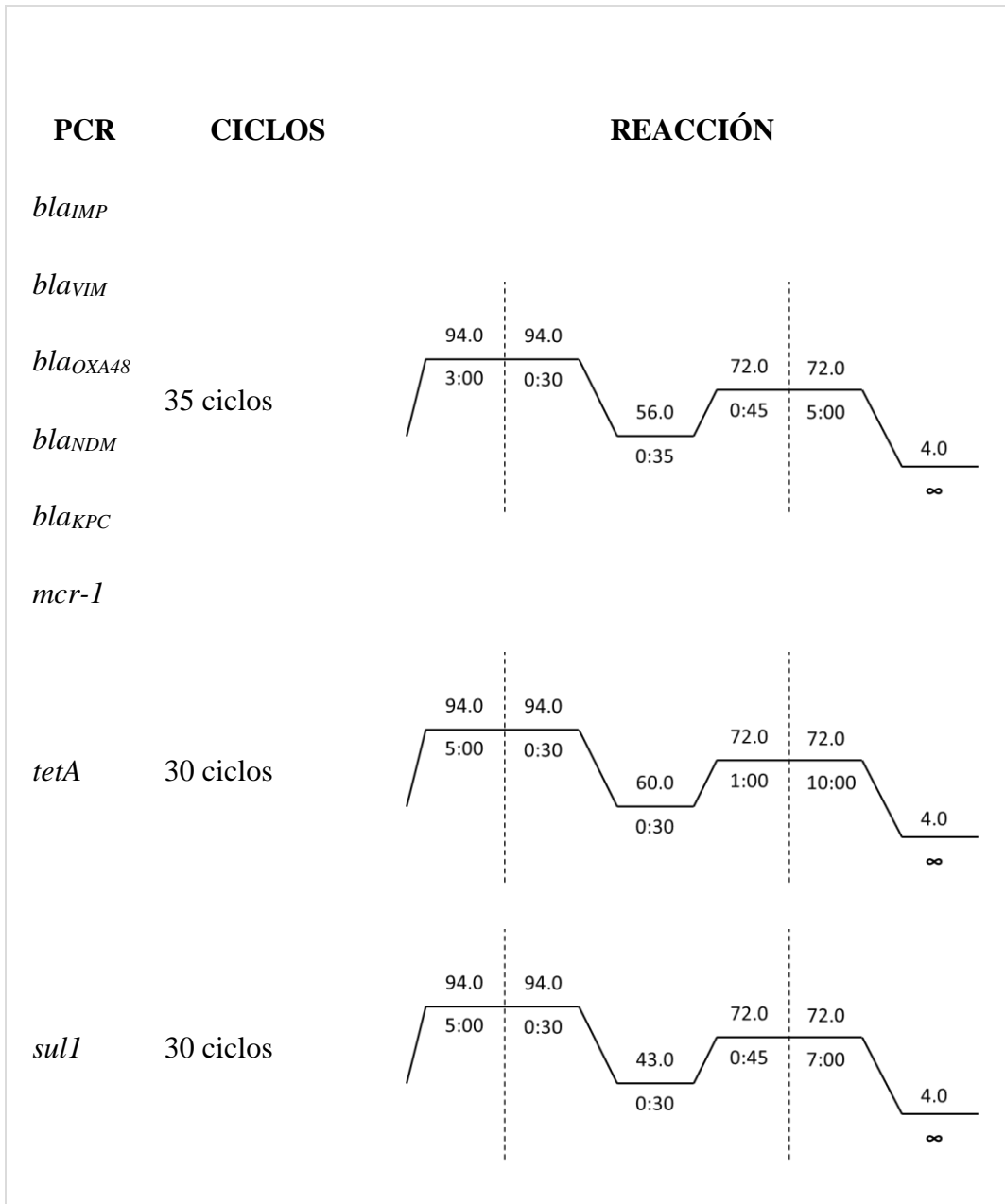
M: marcador de peso molecular; **C+:** control positivo (*sulI*); **1:** CVSP02b1; **2:** CVSP02b2; **3:** CVSP05a; **4:** CVSP04b; **5:** CVSP04a; **6:** CVSP05b; **7:** CVSP12b; **8:** CVPP05b; **9:** C18a, **10:** CVSP15Sa.

Anexo 8. PCR Muestras Individuales (*tetA*)



M: marcador de peso molecular; **C+:** control positivo (*tetA*); **1:** CVSP02b1; **2:** CVSP02b2; **3:** CVSP05a; **4:** CVSP04b; **5:** CVSP04a.

Anexo 9. Condiciones de Reacción de PCR



Anexo 10. Descripción de la procedencia de los aislamientos de E. coli a partir de caninos en la ciudad de Ambato

Muestra ID	Fecha de toma de Muestra	Fecha de Recepción en el Laboratorio de Bacteriología	Origen	Ciudad	# semana de estudio	Especie	Edad	Raza	Sexo	Tipo de Muestra (Origen)	Anamnesis	Antibióticos	Tinción Gram	Catalasa	Levine	McConkey (lactosa)	TSI	Citrato	Urea	Indol	H2S
CVSP02b1	05/01/2018	06/01/2018	Doméstico	Ambato	1	Canina	7 años	Basset Hound	Hembra	Hisopado Rectal	vomito y diarrea. Dx: Gastroenteritis	sulfonamidas + gentamicina , penicilinas	Gram -	+	Colonias negras verdosas con brillo metálico	+	A/A	-	-	-	-
CVSP02b2	05/01/2018	06/01/2018	Doméstico	Ambato	1	Canina	7 años	Basset Hound	Hembra	Hisopado Rectal	vomito y diarrea. Dx: Gastroenteritis	sulfonamidas + gentamicina , penicilinas	Gram -	+	Colonias negras verdosas con brillo metálico	+	A/A	-	-	-	-
CVSP04a	09/01/2018	10/01/2018	Doméstico	Ambato	1	Canina	3 meses	Husky Siberiano	Hembra	Hisopado Rectal	vomito y diarrea. Dx: Gastroenteritis	sulfonamidas + gentamicina	Gram -	+	Colonias negras verdosas con brillo metálico	+	A/A	-	-	-	-
CVSP04b	10/01/2018	11/01/2018	Doméstico	Ambato	1	Canina	3 meses	Husky Siberiano	Hembra	Hisopado Rectal	vomito y diarrea. Dx: Gastroenteritis	sulfonamidas + gentamicina	Gram -	+	Colonias negras verdosas con brillo metálico	+	A/A	-	-	-	-
CVSP05a	05/01/2018	06/01/2018	Doméstico	Ambato	1	Canina	3 años	Shitzu	Macho	Hisopado Rectal	vomito y diarrea. Dx: Gastroenteritis	Macrólidos, Fluoroquinolonas, Sulfonamidas, Macrólidos,	Gram -	+	Colonias negras verdosas con brillo metálico	+	A/A	-	-	-	-
CVSP05b	05/01/2018	06/01/2018	Doméstico	Ambato	1	Canina	3 años	Shitzu	Macho	Hisopado Rectal	vomito y diarrea. Dx: Gastroenteritis	Fluoroquinolonas, Sulfonamidas y Gentamicina	Gram -	+	Colonias negras verdosas con brillo metálico	+	A/A	-	-	-	-
CVSP08a	12/01/2018	13/01/2018	Doméstico	Ambato	2	Canina	2 años	Shitzu	Hembra	Hisopado Rectal	vomito y diarrea. Dx: Gastroenteritis	Enrofloxacin	Gram -	+	Colonias negras verdosas con brillo metálico	+	A/A	-	-	+	-
CVSP08b	12/01/2018	13/01/2018	Doméstico	Ambato	2	Canina	2 años	Shitzu	Hembra	Hisopado Rectal	vomito y diarrea. Dx: Gastroenteritis	Enrofloxacin	Gram -	+	Colonias negras verdosas con brillo metálico	+	A/A	-	-	+	-
CVSP12Sa	12/01/2018	13/01/2018	Doméstico	Ambato	2	Canina	9 años	Doberman Pinscher	Macho	Hisopado Rectal	Sano	Penicilinas	Gram -	+	Colonias negras verdosas con brillo metálico	+	A/A	+	+	-	-
CVSP12Sb	12/01/2018	13/01/2018	Doméstico	Ambato	2	Canina	9 años	Doberman Pinscher	Macho	Hisopado Rectal	Sano	Penicilinas	Gram -	+	Colonias negras verdosas con brillo metálico	+	A/A	+	+	-	-
CVSP12Sc1	12/01/2018	13/01/2018	Doméstico	Ambato	2	Canina	9 años	Doberman Pinscher	Macho	Hisopado Rectal	Sano	Penicilinas	Gram -	+	Colonias negras verdosas con brillo metálico	+	A/A	+	+	-	-
CVSP12Sc2	12/01/2018	13/01/2018	Doméstico	Ambato	2	Canina	9 años	Doberman Pinscher	Macho	Hisopado Rectal	Sano	Penicilinas	Gram -	+	Colonias negras verdosas con brillo metálico	+	A/A	+	+	-	-
CVSP15Sa	12/01/2018	13/01/2018	Doméstico	Ambato	2	Canina	4 meses	Pitbull	Macho	Hisopado Rectal	Sano	N/A	Gram -	+	Colonias negras verdosas con brillo metálico	+	A/A	-	-	+	-
CVSP15Sb	12/01/2018	13/01/2018	Doméstico	Ambato	2	Canina	4 meses	Pitbull	Macho	Hisopado Rectal	Sano	N/A	Gram -	+	Colonias negras verdosas con brillo metálico	+	A/A	-	-	+	-
CVSP17Sa	12/01/2018	13/01/2018	Doméstico	Ambato	2	Canina	1 año	Shitzu	Macho	Hisopado Rectal	Sano	Oxitetraciclina	Gram -	+	Colonias negras verdosas con brillo metálico	+	A/A	-	-	+	-
CVSP17Sb	12/01/2018	13/01/2018	Doméstico	Ambato	2	Canina	1 año	Shitzu	Macho	Hisopado Rectal	Sano	Oxitetraciclina	Gram -	+	Colonias negras verdosas con brillo metálico	+	A/A	-	-	+	-
CVSP18Ea	18/01/2018	19/01/2018	Doméstico	Ambato	3	Canina	2 años	Bulldog Inglés	Macho	Hisopado Rectal	Vómito y diarrea. Dx: Gastroenteritis	Sulfonamidas	Gram -	+	Colonias negras verdosas con brillo metálico	+	A/A	-	-	+	-
CVSP18Eb	18/01/2018	19/01/2018	Doméstico	Ambato	3	Canina	2 años	Bulldog Inglés	Macho	Hisopado Rectal	Vómito y diarrea. Dx: Gastroenteritis	Sulfonamidas	Gram -	+	Colonias negras verdosas con brillo metálico	+	A/A	-	-	+	-
CVSP26Sa	20/01/2018	21/01/2018	Doméstico	Ambato	3	Canina	2 años	Pastor Alemán	Hembra	Hisopado Rectal	Sano	N/A	Gram -	+	Colonias negras verdosas con brillo metálico	+	A/A	-	-	+	-
CVSP26Sb	20/01/2018	21/01/2018	Doméstico	Ambato	3	Canina	2 años	Pastor Alemán	Hembra	Hisopado Rectal	Sano	N/A	Gram -	+	Colonias negras verdosas con brillo metálico	+	A/A	-	-	+	-
C2a	22/01/2018	23/01/2018	Callejero	Ambato	4	Canina	2 años	Mestizo	Macho	Hisopado Rectal	Herida Abrasiva	Ciprofloxacina	Gram -	+	Colonias negras verdosas con brillo metálico	+	A/A	-	-	+	-
C2b	22/01/2018	23/01/2018	Callejero	Ambato	4	Canina	2 años	Mestizo	Macho	Hisopado Rectal	Herida Abrasiva	Ciprofloxacina	Gram -	+	Colonias negras verdosas con brillo metálico	+	A/A	-	-	+	-
C2c	22/01/2018	23/01/2018	Callejero	Ambato	4	Canina	2 años	Mestizo	Macho	Hisopado Rectal	Herida Abrasiva	Ciprofloxacina	Gram -	+	Colonias negras verdosas sin brillo metálico	+	A/A	-	-	+	-
C14a	22/01/2018	23/01/2018	Callejero	Ambato	4	Canina	3 años	Mestizo	Macho	Hisopado Rectal	Sano	N/A	Gram -	+	Colonias negras verdosas con brillo metálico	+	A/A	-	-	+	-
C14b	22/01/2018	23/01/2018	Callejero	Ambato	4	Canina	3 años	Mestizo	Macho	Hisopado Rectal	Sano	N/A	Gram -	+	Colonias negras verdosas con brillo metálico	+	A/A	-	-	+	-
CVSP33Ea	25/01/2018	25/01/2018	Callejero	Ambato	5	Canina	6 años	Bulldog Francés	Macho	Hisopado Rectal	Secreción oclulonasal. Dx: Distemper Canino	Penicilinas	Gram -	+	Colonias negras verdosas con brillo metálico	+	A/A	-	-	+	-
CVSP33Eb	25/01/2018	25/01/2018	Callejero	Ambato	5	Canina	6 años	Bulldog Francés	Macho	Hisopado Rectal	Secreción oclulonasal. Dx: Distemper Canino	Penicilinas	Gram -	+	Colonias negras verdosas con brillo metálico	+	A/A	-	-	+	-
CVSP35E1	27/01/2018	28/01/2018	Doméstico	Ambato	5	Canina	1 mes	Shitzu	Macho	Hisopado Rectal	vomito y diarrea. Dx: Gastroenteritis	N/A	Gram -	+	Colonia negra verdosa con brillo metálico, con halo no muy visible.	+	A/A	-	-	+	-
CVSP35E2	27/01/2018	28/01/2018	Doméstico	Ambato	5	Canina	1 mes	Shitzu	Macho	Hisopado Rectal	vomito y diarrea. Dx: Gastroenteritis	N/A	Gram -	+	colonia ovalada negra verdosa con halo no muy visible.	+	A/A	-	-	+	-

Anexo 11. Descripción de la procedencia de los aislamientos de E. coli a partir de caninos en la ciudad de Ambato

Muestra ID	Fecha de toma de Muestra	Fecha de Recepción en el Laboratorio de Bacteriología	Origen	Ciudad	# semana de estudio	Especie	Edad	Raza	Sexo	Tipo de Muestra (Origen)	Anamnesis	Antibióticos	Tinción Gram	Catalasa	Levine	McConkey (lactosa)	TSI	Citrato	Urea	Indol	H2S
CVSP37E1	27/01/2018	28/01/2018	Doméstico	Ambato	5	Canina	3 meses	Pitbull	Macho	Hisopado Rectal	vomito y diarrea. Dx: Gastroenteritis	N/A	Gram -	+	colonia negra vercosa con halo con brillo metálico forma regular	+	A/A	-	-	+	-
CVSP37E2	27/01/2018	28/01/2018	Doméstico	Ambato	5	Canina	3 meses	Pitbull	Macho	Hisopado Rectal	vomito y diarrea. Dx: Gastroenteritis	N/A	Gram -	+	colonia negra vercosa con brillo metálico con halo no muy visible	+	A/A	-	-	+	-
CVSP39S	27/01/2018	28/01/2018	Doméstico	Ambato	5	Canina	2 años	Poodle	Hembra	Hisopado Rectal	Sano	Penicilinas, ciprofloxacina y sulfonamidas	Gram -	+	colonia negra vercosa con brillo metálico	+	A/A	-	-	+	-
CVSP43S1	27/01/2018	28/01/2018	Callejero	Ambato	5	Canina	2 meses	Poodle	Hembra	Hisopado Rectal	Sano	N/A	Gram -	+	colonia negra vercosa con brillo metálico	+	A/A	-	-	+	-
CVSP43S2	27/01/2018	28/01/2018	Callejero	Ambato	5	Canina	2 meses	Poodle	Hembra	Hisopado Rectal	Sano	N/A	Gram -	+	colonia negra vercosa con brillo metálico	+	A/A	-	-	+	-
CVSP43S3	27/01/2018	28/01/2018	Callejero	Ambato	5	Canina	2 meses	Poodle	Hembra	Hisopado Rectal	Sano	N/A	Gram -	+	colonia negra vercosa con brillo metálico	+	A/A	-	-	+	-
CVSP45E1a	27/01/2018	28/01/2018	Doméstico	Ambato	5	Canina	1 mes	Sharpei	Macho	Hisopado Rectal	vomito y diarrea. Dx: Gastroenteritis por parvovirus	N/A	Gram -	+	colonia negra vercosa con brillo metálico con halo no muy visible	+	A/A	-	-	+	-
CVSP45E1b	27/01/2018	28/01/2018	Doméstico	Ambato	5	Canina	1 mes	Sharpei	Macho	Hisopado Rectal	vomito y diarrea. Dx: Gastroenteritis por parvovirus	N/A	Gram -	+	colonia ovalada negra vercosa con brillo metálico con halo no muy visible	+	A/A	-	-	+	-
CVSP45E2	27/01/2018	28/01/2018	Doméstico	Ambato	5	Canina	1 mes	Sharpei	Macho	Hisopado Rectal	vomito y diarrea. Dx: Gastroenteritis por parvovirus	N/A	Gram -	+	colonia negra vercosa con brillo metálico con halo no muy visible	+	A/A	-	-	+	-
CVSP45E3	27/01/2018	28/01/2018	Doméstico	Ambato	5	Canina	1 mes	Sharpei	Macho	Hisopado Rectal	vomito y diarrea. Dx: Gastroenteritis por parvovirus	N/A	Gram -	+	colonia negra vercosa con brillo metálico sin halo no muy visible, forma irregular	+	A/A	-	-	+	-
CVSP47E1	31/01/2018	31/01/2018	Doméstico	Ambato	5	Canina	9 años	Poodle	Macho	Hisopado Rectal	Vomito y diarrea. Dx: Gastroenteritis por hepatitis	Sulfonamidas, Enrofloxacin y Gentamicina	Gram -	+	Colonia negra vercosa con brillo metálico y halo visible	+	A/A	-	-	+	-
CVSP47E2	31/01/2018	31/01/2018	Doméstico	Ambato	5	Canina	9 años	Poodle	Macho	Hisopado Rectal	Vomito y diarrea. Dx: Gastroenteritis por hepatitis	Sulfonamidas, Enrofloxacin y Gentamicina	Gram -	+	Colonia negra vercosa con brillo metálico y halo no muy visible	+	A/A	-	-	+	-
CVSP48E1	02/02/2018	02/02/2018	Doméstico	Ambato	5	Canina	12 años	Poodle	Macho	Hisopado Rectal	secrecion nasal, ocular. Dx: Traquebronquitis	N/A	Gram -	+	colonia negra vercosa con brillo metálico, bordes irregulares	+	A/A	-	-	+	-
CVSP48E2	02/02/2018	02/02/2018	Doméstico	Ambato	5	Canina	12 años	Poodle	Macho	Hisopado Rectal	secrecion nasal, ocular. Dx: Traquebronquitis	N/A	Gram -	+	colonia negra vercosa con brillo metálico con halo con bordes bien formados	+	A/A	-	-	+	-
C17a	02/02/2018	02/02/2018	Callejero	Cevallos	5	Canina	8 meses	Pitbull	Macho	Hisopado Rectal	Vómito intermitente Dx: Intususcepción	Ampicilina + Sulbactam	Gram -	+	colonia negra vercosa con brillo metálico con halo bordes irregulares.	+	A/A	-	-	+	-
C17b	02/02/2018	02/02/2018	Callejero	Cevallos	5	Canina	8 meses	Pitbull	Macho	Hisopado Rectal	Vómito intermitente Dx: Intususcepción	Ampicilina + Sulbactam	Gram -	+	colonia negra vercosa con brillo metálico con halo bordes bien definidos	+	A/A	-	-	+	-
CVSP49a	03/02/2018	04/02/2018	Doméstico	Ambato	6	Canina	3 años	Mestizo	Macho	Hisopado Rectal	Vómito, diarrea. Dx: Gastroenteritis	N/A	Gram -	+	colonia negra vercosa con brillo metálico son bordes redondeados con halo.	+	A/A	-	-	+	-
CVSP49b	03/02/2018	04/02/2018	Doméstico	Ambato	6	Canina	3 años	Mestizo	Macho	Hisopado Rectal	Vómito, diarrea. Dx: Gastroenteritis	N/A	Gram -	+	colonia negra vercosa ovalada con brillo metálico sin halo.	+	A/A	-	-	+	-
CVSP52a	03/02/2018	04/02/2018	Doméstico	Ambato	6	Canina	14 años	Labrador	Macho	Hisopado Rectal	Gerátrico, osteoartritis	Penicilinas y Sulfonamidas	Gram -	+	colonia negra vercosa con brillo metálico, bordes redondeados, sin halo	+	A/A	-	-	+	-
CVSP52b	03/02/2018	04/02/2018	Doméstico	Ambato	6	Canina	14 años	Labrador	Macho	Hisopado Rectal	Gerátrico, osteoartritis	Penicilinas y Sulfonamidas	Gram -	+	colonia negra vercosa con brillo metálico, bordes irregulares sin halo.	+	A/A	-	-	+	-
CVSP57a	03/02/2018	04/02/2018	Callejero	Ambato	6	Canina	3 años	Mestizo	Macho	Hisopado Rectal	secrecion nasal, ocular. Dx: Traquebronquitis	Penicilinas, quinolonas	Gram -	+	colonia negra vercosa con brillo metálico son bordes redondeados sin halo.	+	A/A	-	-	+	-
CVSP57b	03/02/2018	04/02/2018	Callejero	Ambato	6	Canina	3 años	Mestizo	Macho	Hisopado Rectal	secrecion nasal, ocular. Dx: Traquebronquitis	Penicilinas, quinolonas	Gram -	+	colonia negra vercosa con brillo metálico, con bordes irregulares.	+	A/A	-	-	+	-
C18a	07/02/2018	08/02/2018	Callejero	Ambato	7	Canina	2 años	Mestizo	Hembra	Hisopado Rectal	Sano	N/A	Gram -	+	colonia negra vercosa con brillo metálico	+	A/A	-	-	+	-
C18b	07/02/2018	08/02/2018	Callejero	Ambato	7	Canina	2 años	Mestizo	Hembra	Hisopado Rectal	Sano	N/A	Gram -	+	colonia negra vercosa con brillo metálico sin halo	+	A/A	-	-	+	-
C19a	07/02/2018	08/02/2018	Callejero	Ambato	7	Canina	2 años	Mestizo	Hembra	Hisopado Rectal	Sano	N/A	Gram -	+	colonia negra vercosa con brillo metálico	+	A/A	-	-	+	-
C19b	07/02/2018	08/02/2018	Callejero	Ambato	7	Canina	2 años	Mestizo	Hembra	Hisopado Rectal	Sano	N/A	Gram -	+	colonia negra vercosa con brillo metálico sin halo	+	A/A	-	-	+	-
C20a	07/02/2018	08/02/2018	Callejero	Ambato	7	Canina	16 años	Mestizo	Hembra	Hisopado Rectal	Sano	N/A	Gram -	+	colonia café oscuro sin brillo metálico redondeada	Mixto	A/A	+	+	-	-
C20b	07/02/2018	08/02/2018	Callejero	Ambato	7	Canina	16 años	Mestizo	Hembra	Hisopado Rectal	Sano	N/A	Gram -	+	colonia café oscuro sin brillo metálico bordes irregulares	Mixto	A/A	+	+	-	-
C29a	07/02/2018	08/02/2018	Callejero	Ambato	7	Canina	7 años	Mestizo	Hembra	Hisopado Rectal	Sano	N/A	Gram -	+	colonia negra vercosa con brillo metálico con halo	+	A/A	-	-	+	-

Anexo 12. Descripción de la procedencia de los aislamientos de E. coli a partir de caninos en la ciudad de Ambato

Muestra ID	Fecha de toma de Muestra	Fecha de Recepción en el Laboratorio de Bacteriología	Origen	Ciudad	# semana de estudio	Especie	Edad	Raza	Sexo	Tipo de Muestra (Origen)	Anamnesis	Antibióticos	Tinción Gram	Catalasa	Levine	McConkey (lactosa)	TSI	Citrato	Urea	Indol	H2S
C29b	07/02/2018	08/02/2018	Callejero	Ambato	7	Canina	7 años	Mestizo	Hembra	Hisopado Rectal	Sano	N/A	Gram -	+	colonia negra vercosa con brillo metálico sin halo	+	A/A	-	-	+	-
C30a	07/02/2018	08/02/2018	Callejero	Ambato	7	Canina	9 años	Mestizo	Hembra	Hisopado Rectal	Sano	N/A	Gram -	+	colonia negra vercosa con brillo metálico con halo, bordes redondeados	+	A/A	-	-	+	-
C30b	07/02/2018	08/02/2018	Callejero	Ambato	7	Canina	9 años	Mestizo	Hembra	Hisopado Rectal	Sano	N/A	Gram -	+	colonia negra vercosa con brillo metálico sin halo	+	A/A	-	-	+	-
CVSP60a	09/02/2018	09/02/2018	Doméstico	Ambato	7	Canina	9 años	Sharpei	Macho	Hisopado Rectal	Sarna Demodéica	Penicilinas, ciprofloxacina y sulfonamidas	Gram -	+	colonia negra vercosa con brillo metálico con halo, bordes redondeados	+	A/A	-	-	+	-
CVSP60b	09/02/2018	09/02/2018	Doméstico	Ambato	7	Canina	9 años	Sharpei	Macho	Hisopado Rectal	Sarna Demodéica	Penicilinas, ciprofloxacina y sulfonamidas	Gram -	+	colonia negra vercosa con brillo metálico sin halo	+	A/A	-	-	+	-
CVSP61a	09/02/2018	09/02/2018	Doméstico	Ambato	7	Canina	6 meses	Schnautzer	Hembra	Hisopado Rectal	Vomito, diarrea. Dx: Gastroenteritis por parvovirus	N/A	Gram -	+	colonia negra vercosa con brillo metálico sin halo	+	A/A	-	-	+	-
CVSP61b	09/02/2018	09/02/2018	Doméstico	Ambato	7	Canina	6 meses	Schnautzer	Hembra	Hisopado Rectal	Vomito, diarrea. Dx: Gastroenteritis por parvovirus	N/A	Gram -	+	colonia negra vercosa con brillo metálico con halo, bordes redondeados	+	A/A	-	-	+	-
CVSP62a	10/02/2018	11/02/2018	Doméstico	Ambato	7	Canina	4 meses	Pekínés	Hembra	Hisopado Rectal	Sano	N/A	Gram -	+	colonia negra vercosa con brillo metálico con halo, bordes redondeados	+	A/A	-	-	+	-
CVSP62b	10/02/2018	11/02/2018	Doméstico	Ambato	7	Canina	4 meses	Pekínés	Hembra	Hisopado Rectal	Sano	N/A	Gram -	+	colonia negra vercosa con brillo metálico sin halo	+	A/A	-	-	+	-
CVSP68a	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	15 años	Poodle	Macho	Hisopado Rectal	Sano	Enrofloxacin y Sulfonamidas	Gram -	+	colonia negra oscura sin brillo metálico, forma irregular	+	A/A	-	-	+	-
CVSP68b	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	15 años	Poodle	Macho	Hisopado Rectal	Sano	Enrofloxacin y Sulfonamidas	Gram -	+	colonia redonda negra oscura, sin brillo metálico.	+	A/A	-	-	+	-
CVSP69a	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	2 años	Doberman	Macho	Hisopado Rectal	Sano	Enrofloxacin, Sulfonamidas y Macrólidos	Gram -	+	colonia transparente sin brillo metálico con halo	+	A/A	-	-	+	-
CVSP69b	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	2 años	Doberman	Macho	Hisopado Rectal	Sano	Enrofloxacin, Sulfonamidas y Macrólidos	Gram -	+	colonia negra oscura redonda sin brillo metálico.	+	A/A	-	-	+	-
CVSP73a	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	10 años	Poodle	Hembra	Hisopado Rectal	Osteoartritis	Penicilinas, sulfonamidas y macrólidos	Gram -	+	colonia negra oscura, sin brillo metálico, forma irregular	+	A/A	-	-	+	-
CVSP73b	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	10 años	Poodle	Hembra	Hisopado Rectal	Osteoartritis	Penicilinas, sulfonamidas y macrólidos	Gram -	+	colonia negra oscura sin brillo metálico, bordes redondeados.	+	A/A	-	-	+	-
CVSP76a	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	2 años	Yorkshire	Hembra	Hisopado Rectal	Sano	N/A	Gram -	+	colonia negra oscura, sin brillo metálico, bordes redondeados	+	A/A	-	-	+	-
CVSP76b	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	2 años	Yorkshire	Hembra	Hisopado Rectal	Sano	N/A	Gram -	+	colonia transparente sin brillo metálico, sin halo.	+	A/A	-	-	+	-
CVSP77a	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	8 años	Mestizo	Macho	Hisopado Rectal	Sano	N/A	Gram -	+	colonia negra oscura, con brillo metálico, bordes redondeados, sin halo.	+	A/A	-	-	+	-
CVSP77b	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	8 años	Mestizo	Macho	Hisopado Rectal	Sano	N/A	Gram -	+	colonia negra oscura con brillo metálico, con halo	+	A/A	-	-	+	-
CVSP79a	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	4 meses	Mestizo	Hembra	Hisopado Rectal	Sano	Sulfonamidas y gentamicina	Gram -	+	colonia negra oscura sin brillo metálico, forma irregular	+	A/A	-	-	+	-
CVSP79b	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	4 meses	Mestizo	Hembra	Hisopado Rectal	Sano	Sulfonamidas y gentamicina	Gram -	+	colonia negra oscura sin brillo metálico, bordes redondeados.	+	A/A	-	-	+	-
CVPP02a	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	6 años	Schnautzer	Hembra	Hisopado Rectal	Raquitismo	Cefalexina y Eritromicina	Gram -	+	colonia negra oscura sin brillo metálico, bordes redondeados.	Mixto	A/A	+	-	-	-
CVPP02b	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	6 años	Schnautzer	Hembra	Hisopado Rectal	Raquitismo	Cefalexina y Eritromicina	Gram -	+	colonia negra oscura sin brillo metálico, forma irregular	Mixto	A/A	+	-	-	-
CVPP03a	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	3 meses	Poodle	Hembra	Hisopado Rectal	Sano	N/A	Gram -	+	colonia negra oscura con brillo metálico, bordes redondeados.	+	A/A	-	-	+	-
CVPP03b	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	3 meses	Poodle	Hembra	Hisopado Rectal	Sano	N/A	Gram -	+	colonia negra oscura con brillo metálico, forma irregular.	+	A/A	-	-	+	-
CVPP04a	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	8 años	Mestizo	Hembra	Hisopado Rectal	Dermatitis	N/A	Gram -	+	colonia negra oscura sin brillo metálico, con halo visible.	+	A/A	-	-	+	-
CVPP04b	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	8 años	Mestizo	Hembra	Hisopado Rectal	Dermatitis	N/A	Gram -	+	colonia negra oscura sin brillo metálico, forma irregular	+	A/A	-	-	+	-
CVPP05a	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	6 meses	Cocker spaniel	Hembra	Hisopado Rectal	Distemper canino	N/A	Gram -	+	colonia negra oscura sin brillo metálico, con bordes redondeados.	+	A/A	-	-	+	-
CVPP05b	17/02/2018	18/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	6 meses	Cocker spaniel	Hembra	Hisopado Rectal	Distemper canino	N/A	Gram -	+	colonia negra oscura sin brillo metálico, bordes irregulares.	+	A/A	-	-	+	-

Anexo 13. Descripción de la procedencia de los aislamientos de E. coli a partir de caninos en la ciudad de Ambato

Muestra ID	Fecha de toma de Muestra	Fecha de Recepción en el Laboratorio de Bacteriología	Origen	Ciudad	# semana de estudio	Especie	Edad	Raza	Sexo	Tipo de Muestra (Origen)	Anamnesis	Antibióticos	Tinción Gram	Catalasa	Levine	McConkey (lactosa)	TSI	Citrato	Urea	Indol	H2S
CVPP06	23/02/2018	23/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	3 años	Mestizo	Hembra	Hisopado Rectal	Sano	N/A	Gram -	+	colonia negra oscura sin brillo metálico, bordes redondeados	+	A/A	-	-	+	-
CVPP07a1	23/02/2018	23/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	5 meses	Poodle	Macho	Hisopado Rectal	Distemper canino	N/A	Gram -	+	colonia negra oscura sin brillo metálico, forma irregular	+	A/A	-	-	+	-
CVPP07a2	23/02/2018	23/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	5 meses	Poodle	Macho	Hisopado Rectal	Distemper canino	N/A	Gram -	+	colonia negra oscura sin brillo metálico, bordes redondeados.	+	A/A	-	-	+	-
CVPP07b1	23/02/2018	23/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	5 meses	Poodle	Macho	Hisopado Rectal	Distemper canino	N/A	Gram -	+	colonia negra oscura ovalada sin brillo metálico	+	A/A	-	-	+	-
CVPP07b2	23/02/2018	23/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	5 meses	Poodle	Macho	Hisopado Rectal	Distemper canino	N/A	Gram -	+	colonia negra oscura sin brillo metálico, tipo estrella.	+	A/A	-	-	+	-
CVPP07c	23/02/2018	23/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	5 meses	Poodle	Macho	Hisopado Rectal	Distemper canino	N/A	Gram -	+	colonia negra oscura sin brillo metálico, bordes irregulares.	+	A/A	-	-	+	-
CVPP08	23/02/2018	23/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	14 años	Golden Retriever	Macho	Hisopado Rectal	Secreción nasal y ocular. Dx: Neumonía	Enrofloxacin y tilosina	Gram -	+	colonia negra oscura, sin brillo metálico, sin halo	+	A/A	-	-	+	-
CVSP81a	23/02/2018	23/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	3 meses	Pitbull	Macho	Hisopado Rectal	Vómito, diarrea. Dx: Gastroenteritis por parvovirus.	Sulfonamidas	Gram -	+	Colonia negra verdosa con brillo metálico, con halo no muy visible.	+	A/A	-	-	+	-
CVSP81b	23/02/2018	23/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	3 meses	Pitbull	Macho	Hisopado Rectal	Vómito, diarrea. Dx: Gastroenteritis por parvovirus.	Sulfonamidas	Gram -	+	colonia negra verdosa sin brillo metálico, sin halo.	+	A/A	-	-	+	-
CVSP83a	23/02/2018	23/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	10 años	Poodle	Macho	Hisopado Rectal	Secreción nasal y ocular. Dx: Traqueobronquitis	N/A	Gram -	+	Colonia negra verdosa con brillo metálico, sin halo.	+	A/A	-	-	+	-
CVSP83b	23/02/2018	23/02/2018	Doméstico	Ambato	8	Canina	10 años	Poodle	Macho	Hisopado Rectal	Secreción nasal y ocular. Dx: Traqueobronquitis	N/A	Gram -	+	Colonia negra verdosa con brillo metálico, con halo no muy visible.	+	A/A	-	-	+	-
C36	23/02/2018	23/02/2018	Callejero	Cevallos	8	Canina	4 años	Mestizo	Macho	Hisopado Rectal	Sano	N/A	Gram -	+	colonia negra oscura, sin brillo metálico.	+	A/A	-	-	+	-
CVSP84	24/02/2018	25/02/2018	Doméstico	Ambato	9	Canina	4 meses	Mestizo	Macho	Hisopado Rectal	Sano	N/A	Gram -	+	colonia negra verdosa con brillo metálico, forma regular.	+	A/A	-	-	+	-
CVSP85	24/02/2018	25/02/2018	Doméstico	Ambato	9	Canina	3 años	Teckel	Macho	Hisopado Rectal	Politraumatizado	N/A	Gram -	+	colonia negra verdosa, con brillo metálico, borde redondeados, con halo.	+	A/A	-	-	+	-
CVSP89	24/02/2018	25/02/2018	Doméstico	Ambato	9	Canina	1 año	Boxer	Hembra	Hisopado Rectal	Vómito, diarrea. Dx: Gastroenteritis	Macrólidos, sulfonamidas y penicilinas	Gram -	+	colonia negra verdosa con brillo metálico, forme regular.	+	A/A	-	-	+	-
CVSP93	24/02/2018	25/02/2018	Doméstico	Ambato	9	Canina	2 meses	Poodle	Macho	Hisopado Rectal	Vómito, diarrea. Dx: Gastroenteritis	N/A	Gram -	+	colonia negra verdosa, con brillo metálico, forma irregular.	+	A/A	-	-	+	-
CVSP94	24/02/2018	25/02/2018	Doméstico	Ambato	9	Canina	3 años	Pitbull	Hembra	Hisopado Rectal	Sano, Gestante	N/A	Gram -	+	colonia negra verdosa, con brillo metálico, forma redondeada.	+	A/A	-	-	+	-
CVSP95a	24/02/2018	25/02/2018	Doméstico	Ambato	9	Canina	4 años	Pitbull	Macho	Hisopado Rectal	Sano, control vacunal	N/A	Gram -	+	colonia negra verdosa, con brillo metálico, forma regular.	+	A/A	-	-	+	-
CVSP95b	24/02/2018	25/02/2018	Doméstico	Ambato	9	Canina	4 años	Pitbull	Macho	Hisopado Rectal	Sano, control vacunal	N/A	Gram -	+	colonia negra verdosa con brillo metálico, forma regular.	+	A/A	-	-	+	-
CVSP98a	24/02/2018	25/02/2018	Doméstico	Ambato	9	Canina	2 meses	Bull Terrier	Hembra	Hisopado Rectal	Vómito, diarrea. Dx: Gastroenteritis	Sulfonamidas + quinolonas	Gram -	+	colonias café oscuras sin brillo metálico, forma redondeada.	+	A/A	-	-	+	-
CVSP98b	24/02/2018	25/02/2018	Doméstico	Ambato	9	Canina	2 meses	Bull Terrier	Hembra	Hisopado Rectal	Vómito, diarrea. Dx: Gastroenteritis	Sulfonamidas + quinolonas	Gram -	+	colonias café oscuras sin brillo metálico, forma irregular.	+	A/A	-	-	+	-
CVSP99	24/02/2018	25/02/2018	Doméstico	Ambato	9	Canina	2 meses	Bull Terrier	Macho	Hisopado Rectal	Vómito, diarrea. Dx: Gastroenteritis	Sulfonamidas + quinolonas	Gram -	+	colonia negra verdosa con brillo metálico, bordes redondeados.	+	A/A	-	-	+	-
CVPP12a	24/02/2018	25/02/2018	Doméstico	Ambato	9	Canina	3 años	Schnautzer	Macho	Hisopado Rectal	Intoxicación	N/A	Gram -	+	colonia negra verdosa, con brillo metálico, bordes redondeados.	+	A/A	-	-	+	-
CVPP12b	24/02/2018	25/02/2018	Doméstico	Ambato	9	Canina	3 años	Schnautzer	Macho	Hisopado Rectal	Intoxicación	N/A	Gram -	+	colonia negra verdosa, con brillo metálico, forma irregular.	+	A/A	-	-	+	-
CVSP100a	27/02/2018	27/02/2018	Doméstico	Ambato	9	Canina	10 años	Poodle	Hembra	Hisopado Rectal	Neoplasias	Sulfonamidas, quinolonas y cefalexina	Gram -	+	colonia café oscura, sin brillo metálico, bordes redondeados.	Mixto	A/K	+	-	-	-
CVSP100b	27/02/2018	27/02/2018	Doméstico	Ambato	9	Canina	10 años	Poodle	Hembra	Hisopado Rectal	Neoplasias	Sulfonamidas, quinolonas y cefalexina	Gram -	+	colonia negra verdosa con brillo metálico, con halo visible.	+	A/A	-	-	+	-
C37	27/02/2018	27/02/2018	Callejero	Cevallos	9	Canina	5 años	Mestizo	Macho	Hisopado Rectal	Sano	N/A	Gram -	+	colonia negra verdosa, con brillo metálico, forma regular.	+	A/A	-	-	+	-

CAPÍTULO VII

PROPUESTA

7.1. DATOS DE LA PROPUESTA.

Implementación de un servicio de vigilancia epidemiológica veterinaria en resistencia antimicrobiana emergente, en el Laboratorio UTA-RAM-One Health del Centro de Investigaciones Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.

7.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA

Escherichia coli es un bacilo Gram (-), anaerobio facultativo, descubierto por primera vez por Theodore Escherich en 1885, este microorganismo generalmente actúa de forma benigna y está compuesto por la microbiota normal de los caninos durante su ciclo de vida, aunque actúen como comensales es decir no son patógenos, pueden ocasionar infecciones oportunistas en zonas extra intestinales, especialmente en la glándula mamaria y el tracto urinario. Se integra al hospedador una vez que hay primer contacto con fuentes ambientales contaminadas después del nacimiento.

Hoy en día, el uso incontrolable e innecesario en algunas ocasiones de antibióticos, para control de enfermedades, es la principal causa de resistencia bacteriana. Existen dos tipos de resistencia: natural y adquirida, la primera no se da por la cantidad o el uso erróneo de antibióticos, sino depende más de la estructura y fisiología de la bacteria para adaptarse al medio, y la segunda si es por el uso erróneo de antibióticos, el cual la bacteria crea resistencia mediante transferencia de genes a través de plásmidos, transposones e integrones.

Los caninos, que fueron unidades de análisis en nuestra investigación y los genes de resistencia son un grave problema de salud pública para la sociedad, existen una gran cantidad de información que los caninos pueden actuar como reservorios de estos genes

de forma silenciosa y la posible transmisión al ser humano, mediante un mecanismo de transferencia genética denominada conjugación.

En nuestro estudio se analizó el porcentaje de caninos que presenten los genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{VIM}*, *mcr-1*, y adicionalmente, el gen *sul1*, y el gen *tetA* en la ciudad de Ambato, provincia del Tungurahua. Determinando que si hay un alto porcentaje de presencia de estos determinantes de resistencia en los animales analizados, lo cual nos da una perspectiva para continuar con más estudios, que incluso nos podría servir para aplicar a los dueños de las mascotas que fueron analizadas, para determinar si existe la transferencia de estos genes, y que tan peligroso es para las personas que se encuentran en contacto de cada una de ellos.

7.3. JUSTIFICACIÓN

Debido a los resultados obtenidos en el presente estudio la principal causa de resistencia a antibióticos, podría ser el uso incontrolable de estos, y por ende son un problema para la sociedad, se debería analizar si los caninos podrían actuar como potenciales reservorios de microorganismos portadores de genes de resistencia a antibióticos, con potencial zoonótico.

7.4. OBJETIVOS.

- Ofertar un servicio de aislamiento bacteriano y realización de antibiogramas.
- Extender el conocimiento de resistencia bacteriana a la sociedad.
- Ofertar servicios de diagnóstico basados en biología molecular aplicados al sector agropecuario en la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

7.5 ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD

Al realizar estas pruebas diagnósticas, favoreceríamos la selección adecuada de tratamientos de quimioterapia antibiótica en el sector veterinario de la provincia, el cual es un problema observado de manera diaria en la clínica de pequeñas especies. Se evaluaría la potencial diseminación de genes de resistencia emergente en animales y por

ende se evitaría la transmisión silenciosa de estos elementos de resistencia en la sociedad humana, traduciéndose en una menor mortalidad en el tratamiento de enfermedades; así como la adquisición de información útil que puede permitir tomar medidas necesarias para evitar la generación y diseminación de clones resistentes y multiresistentes en animales, humanos y el medio ambiente.

7.6. METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO.

Ofertar un servicio de aislamiento y caracterización fenotípica y genotípica de microorganismos de interés veterinario y salud pública.

Determinar la presencia de genes de resistencia a antibióticos emergentes en aislados bacterianos de animales de compañía, animales de producción, alimentos y medio ambiente, mediante PCRm, y gestionar la información obtenida con la finalidad de detectar eventos inusuales, de potencial importancia epidemiológica.

7.7. ADMINISTRACIÓN

La Universidad Técnica de Ambato mediante el personal de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia en conjunto con el Laboratorio UTA-RAM-One Health del Centro de Investigaciones Agropecuarias, serían los responsables de la realización de esta propuesta para beneficio de toda la sociedad.

7.8. PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN

Anualmente, la Facultad de Ciencias Agropecuarias debe realizar una vigilancia epidemiológica de los perfiles de resistencia de microorganismos del sector veterinario y ambiental, con la finalidad de detectar potenciales cambios anómalos de potencial interés epidemiológico.