

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

INFORME DE INVESTIGACIÓN SOBRE:

"CARACTERIZACIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* BLEE Y *SALMONELLA SP.* EN TRABAJADORES DE GRANJAS AVÍCOLAS DE LA ZONA 3"

Requisito previo para optar por el Título de Licenciado en Laboratorio Clínico

Autor: Escudero Heredia Steeven Patricio

Tutora: BqCl. Mg. Jaramillo Ruales, Evelyn Katherine

Ambato – Ecuador

Febrero 2025

APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de Tutora del Proyecto de Investigación con el tema: **"CARACTERIZACIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* BLEE Y *SALMONELLA SP.* EN TRABAJADORES DE GRANJAS AVÍCOLAS DE LA ZONA 3"** del Sr. Escudero Heredia Steeven Patricio, estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Técnica de Ambato. Considero que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la evaluación por el jurado examinador designado por el Honorable Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias de la Salud.

Ambato, febrero 2025

LA TUTORA

Firmado electrónicamente por:
EVELYN KATHERINE
JARAMILLO RUALES

BqCl. Mg. Jaramillo Ruales, Evelyn Katherine

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Los criterios emitidos en el Trabajo de Investigación sobre:

"CARACTERIZACIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* BLEE Y *SALMONELLA SP.* EN TRABAJADORES DE GRANJAS AVÍCOLAS DE LA ZONA 3" como también los contenidos, ideas, objetivos y futura aplicación del trabajo de investigación son de exclusiva responsabilidad de mi persona, como autor de este trabajo de grado.

Ambato, febrero 2025

EL AUTOR

Firmado electrónicamente por:
STEEVEN PATRICIO
ESCUDERO HEREDIA

Escudero Heredia Steeven Patricio

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de esta tesis o parte de ella un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación.

Cedo los derechos en línea patrimonial de mi tesis con fines de difusión pública: además apruebo la reproducción de este proyecto de investigación, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

Ambato, febrero 2025

EL AUTOR



Firmado electrónicamente por:
STEEVEN PATRICIO
ESCUDERO HEREDIA

Escudero Heredia Steeven Patricio

APROBACIÓN DEL JURADO EXAMINADOR

Los miembros del Tribunal Examinador aprueban el Informe de Investigación, sobre el tema: **"CARACTERIZACIÓN DE ESCHERICHIA COLI BLEE Y SALMONELLA SP. EN TRABAJADORES DE GRANJAS AVÍCOLAS DE LA ZONA 3"** de Escudero Heredia Steeven Patricio, estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico.

Ambato, febrero 2025

Para constancia firman:

……...	**……....**	**……**
PRESIDENTE/A	**1er VOCAL**	**2do VOCAL**

DEDICATORIA

"En vida guiaste cada uno de mis pasos y hoy desde el cielo me cuidarás por siempre". Me invade la tristeza saber que este logro no lo compartiste conmigo, pero sé que dónde estés, te sientes muy orgulloso de mi. Por eso, con mucho cariño te dedico este triunfo papi Alfredo.

A Dios por darme las fuerzas, paciencia y sabiduría para seguir adelante pese a las circunstancias que se presentan en la vida.

A mis padres, Patricio Escudero, la persona quién me enseñó a ser un hombre de bien, Mariana Heredia, quién ha sido mi confidente y luz en mi vida, y a mi abuelita Eugenia Peñaherrera (mi segunda madre) por darme su amor incondicional y nunca dejarme solo.

A mis hermanos: Matías, Patricia y el pequeño Santi, de quiénes soy su ejemplo a seguir y así como ellos han aprendido tanto de mí, de igual forma me han enseñado a valorar los pequeños momentos de la vida.

A mi familia más cercana, mis tías, Karina, Marisol, Kelly, mi tío Luis y mi prima Daniela (mi chicle) por estar siempre pendientes de mí, con una llamada, un mensaje, un abrazo y su cariño especial.

Finalmente, a mis tres grandes amigos, Dannita, Ismael (Chino) y Francisco, que desde el colegio hasta el día de hoy hemos sido inseparables, han estado para mí en las buenas y en las malas.

Escudero Steeven

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a Dios por permitirme llegar hasta este momento crucial en mi vida. Nuevamente agradecer a toda mi familia quiénes fueron parte fundamental en este difícil camino, especialmente mamá y papá que han trabajado duro por darme un mejor futuro y que sea un gran profesional, pero sobre todo por apoyarme siempre. Es así como nunca me rendiré y perseguiré mis sueños sin importar las adversidades.

Me siento muy agradecido con los profesionales del Hospital General Provincial de Latacunga del Laboratorio Clínico. Muchas gracias Dra. Johanna Brito por abrirme las puertas del servicio y hasta el día de hoy seguir aprendiendo, cada día más de esta maravillosa carrera. De igual forma, a la Dra. Yolanda Almache y Mg. Mario López, quiénes me ayudaron en todo este camino, compartiendo juntos la afición por la Microbiología y recordarme lo importante que es hacer bien las cosas.

Al personal que conforman el UTALABB, el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de Querochaca por haberme permitido llevar a cabo este proyecto.

A mi querida tutora, BqCl. Mg. Katherine Jaramillo, muchas gracias por sus consejos, no solo en el aspecto académico sino también en lo personal. Fue la persona que con su experiencia y arduo trabajo me ha enseñado mucho. Confió en mí y no la defraude, haciendo lo posible para que este proyecto resultará de la mejor manera.

A mi grupito de amigos, Dani, Omar, Nathy, Isma, Gaby, Dony, Sebitas y Wendy que juntos logramos superar un sin número de adversidades en la carrera, y así como jamás faltaron risas, siempre estuvieron para apoyarme en los momentos más difíciles. También a aquellos amigos que fui conociendo a lo largo de la carrera e incluso por finalizarla, Alejandrina, Jenny, Vicky, Karen, Bryan, Luchito, Micha y Anderson los guardo en un espacio muy especial de mi corazón, los quiero mucho.

Escudero Steeven

ÍNDICE GENERAL

APROBACIÓN DEL TUTOR ii
AUTORIA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN iii
DERECHOS DE AUTOR iv
APROBACIÓN DEL JURADO EXAMINADOR v
DEDICATORIA vi
AGRADECIMIENTO vii
RESUMEN xv
SUMMARY xvii
INTRODUCCIÓN 1
CAPITULO I 5
MARCO TEÓRICO 5
1.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS 5
1.2 FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA 11
1.2.1 *Escherichia coli* 11
1.2.3 *Escherichia coli* BLEE y *Salmonella sp.* en granjas avícolas 11
1.2.4 Aislamiento e identificación bacteriana 12
1.2.5 Resistencia a los antibióticos 13
1.2.6 Susceptibilidad antimicrobiana 14
1.2.7 Caracterización genotípica de genes BLEE 16
1.3 OBJETIVOS 18
1.3.1 OBJETIVO GENERAL 18
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 18
CAPITULO II 19
METOLOGÍA 19
2.1 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS 19
2.1.1 Humanos 19
2.1.2 Institucionales 19
2.1.3 Materiales 19
2.1.4 Reactivos 20
2.1.5 Equipos 20
2.2 MÉTODOS 20

2.2.1 Nivel o tipo de investigación 20
2.2.2 Enfoque de la investigación 21
2.3 SELECCIÓN DEL ÁREA O ÁMBITO DE ESTUDIO 21
2.3.1 Campo y área 21
2.3.2 Delimitación Temporal 21
2.3.2 Delimitación Espacial 21
2.4 POBLACIÓN Y MUESTRA 21
2.5 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN 22
2.5.1 Grupo Experimental 22
2.5.2 Grupo Control 22
2.6 VARIABLES DE LA INVESTIGACIÓN 23
2.7 MÉTODOS DE RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN 23
2.8 PRUEBAS ESTADÍSTICAS 23
2.9 DESCRIPCIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS 23
2.9.1 Consentimiento Informado 23
2.9.2 Codificación de los pacientes 24
2.9.3 Protocolo de toma de muestra de heces 24
2.9.4. Protocolo de toma de muestra de hisopado de manos 26
2.9.5. Aislamiento bacteriano 27
2.9.6 Pruebas Bioquímicas 27
2.9.7 Determinación de la Susceptibilidad a los antibióticos 28
2.9.8 Extracción de ADN 29
2.9.9 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 30
2.9.10 Control de calidad 33
CAPITULO III 40
RESULTADOS Y DISCUSIÓN 40
3.1 ANÁLISIS E INTERPREATCIÓN DE RESULTADOS 40
3.1.1 Análisis Microbiológico 40
3.1.2 Análisis Molecular 46
3.1.3 Análisis de los datos demográficos de la población colonizada 48
3.1.4 Análisis de la encuesta 50
3.2 ASOCIACION DE FACTORES DE RIESGO CON TRABAJADORES COLONIZADOS CON *E. coli* BLEE 57

3.2 VALIDACIÓN DE LA HIPÓTESIS 59
3.3 DISCUSIÓN 60
CAPITULO IV 66
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 66
4.1 CONCLUSIONES 66
4.2 RECOMENDACIONES 67
REFERENICAS BIBLIOGRÁFICAS 68
ANEXOS 75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Preparación de la Master Mix 30
Tabla 2. Cebadores empleados en la PCR..... 31
Tabla 3. Temperatura/tiempo de la reacción 31
Tabla 4. Control de calidad Agar EMB + Ceftriaxona..... 34
Tabla 5. Control de calidad Agar XLD 34
Tabla 6. Control de calidad de los discos de antibióticos 35
Tabla 7. Concentraciones de ADN de las muestras de E. coli BLEE 36
Tabla 8. Controles usados para el estudio molecular 37
Tabla 9. Morfología macroscópica de los microorganismos en estudio 40
Tabla 10. Resultados de las pruebas bioquímicas de los microorganismos en estudio 41
Tabla 11. Perfil de susceptibilidad de cepas BLEE + AmpC..... 45
Tabla 12. Tabla cruzada de la Pregunta 9. ¿En el último año se le ha diagnosticado alguna infección gastrointestinal? 58
Tabla 13. Tabla cruzada para la validación de la hipótesis 59

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Mecanismos de resistencia antimicrobiana 14
Gráfico 2. Guía pata la toma de muestra de heces 26
Gráfico 3. Detección de BLEE. Sinergismos con un inhibidor..... 29
Gráfico 4. Caracterización genotípica de genes productores de BLEE 33
Gráfico 5. Flujograma de recolección y toma de muestra..... 38
Gráfico 6. Flujograma del cultivo e identificación de Escherichia coli y Salmonella sp. 39
Gráfico 7. Microorganismos identificados..... 41
Gráfico 8. Sinergismo positivo para BLEE..... 42
Gráfico 9. Gráfico 8. Perfil de susceptibilidad de Escherichia coli BLEE 42
Gráfico 10. Perfil de susceptibilidad de Escherichia coli BLEE bla_{CTX-M} 43
Gráfico 11. Perfil de susceptibilidad de Escherichia coli BLEE bla_{CTX-M} y bla_{TEM}.. 44
Gráfico 12. Electroforesis del gen bla_{CTX-M} 46
Gráfico 13. Electroforesis del gen bla_{TEM} 47
Gráfico 14. Electroforesis del gen bla_{SHV}..... 47
Gráfico 15. Reporte de genes productores de BLEE..... 47
Gráfico 16. Género..... 48
Gráfico 17. Edad..... 49
Gráfico 18. Área de trabajo 49
Gráfico 19. Pregunta 1. ¿Cuánto tiempo lleva trabajando en esta unidad?..... 50
Gráfico 20. Pregunta 3. ¿Qué tipo de protección personal usa?..... 51
Gráfico 21. Pregunta 4. Si usa uniforme para sus actividades, ¿se lo retira antes de ir a casa? 51
Gráfico 22. Pregunta 5. ¿Tiene contacto directo con los animales?..... 52
Gráfico 23. Pregunta 6. ¿Ha tenido contacto directo con algún fluido animal? (sangre, heces, orina) 53
Gráfico 24. Pregunta 7. ¿Consume usted y/o su familia los productos que se generan en la unidad? 53
Gráfico 25. Pregunta 8. ¿Qué tipo de animales tiene en su casa? 54
Gráfico 26. Pregunta 9. ¿En el último año se le ha diagnosticado alguna infección gastrointestinal?..... 54
Gráfico 27. Pregunta 10. ¿Ha presentado alguno de los siguientes síntomas relacionados con una afección gastrointestinal en el último mes?..... 55
Gráfico 28. Pregunta 11. ¿En los últimos 6 meses, ¿ha estado usted bajo algún tratamiento antibiótico?..... 56
Gráfico 29. Pregunta 12. ¿Sabe usted que el uso prolongado de antibióticos puede inducir el desarrollo de resistencia bacteriana a los antibióticos?..... 56
Gráfico 30. Relación entre el área de trabajo y conocimiento de las consecuencias del uso prolongado de antibióticos 57
Gráfico 31. Cálculo de la prueba del Chi-cuadrado para validación de un factor de riesgo..... 58
Gráfico 32. Cálculo de la prueba del Chi-cuadrado para validación de hipótesis..... 59

Gráfico 33. Socialización del Proyecto de Investigación 75
Gráfico 34. Preparación de medios de cultivo y pruebas bioquímicas 75
Gráfico 35. Toma de muestras 76
Gráfico 36. Pre-enriquecimiento de las muestras de heces e hisopados de manos en agua peptonada 76
Gráfico 37. Cultivo e aislamiento bacteriológico 77
Gráfico 38. Identificación de Escherichia coli y Salmonella sp. con pruebas bioquímicas 77
Gráfico 39. OXOID Turbidometer. Escala 0,5 McFarland 78
Gráfico 40. Lectura e interpretación de la prueba de sinergia con un inhibidor y antibiogramas 78
Gráfico 41. Cepa productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) 79
Gráfico 42. Extracción de ADN bacteriano por shock térmico 79
Gráfico 43. Cuantificación de ADN en el equipo Nanodrop 80
Gráfico 44. Preparación de la Master Mix y realización de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 80
Gráfico 45. Corrida electroforética 81
Gráfico 46. Resultados de la electroforesis de los genes bla_{CTX-M}, bla_{TEM} y bla_{SHV} . 81

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Fotografías del desarrollo del Proyecto de Investigación 75
Anexo 2. Operacionalización de las variables 82
Anexo 3. Encuesta de Factores de riesgo..... 85
Anexo 4. Consentimiento Informado..... 88

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

"CARACTERIZACIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* BLEE Y *SALMONELLA SP*. EN TRABAJADORES DE GRANJAS AVÍCOLAS DE LA ZONA 3"

Autor: Escudero Heredia Steeven Patricio
Tutora: BqCl. Mg. Jaramillo Ruales, Evelyn Katherine
Fecha: Febrero 2025

RESUMEN

El uso indiscriminado de antibióticos en granjas avícolas promueve la aparición de bacterias resistentes como *Escherichia coli* BLEE y *Salmonella sp.* durante la cadena de producción avícola[1], representado un problema de salud pública debido al potencial zoonótico de transmisión [2]. El presente proyecto de investigación tuvo como objetivo caracterizar cepas de *Escherichia coli* BLEE y *Salmonella sp.* en trabajadores de granjas avícolas de la Zona 3 durante el período septiembre 2024 – febrero 2025 mediante una investigación observacional de tipo descriptiva trasversal. Se analizaron 128 muestras, entre heces e hisopados de manos respectivamente de 64 trabajadores. Los resultados mostraron ausencia de colonización de *Salmonella sp. y* una elevada prevalencia de *E. coli* BLEE (56%), donde se presentó un perfil de susceptibilidad con un bajo poder de hidrólisis para ceftazidima, resistencia en menor proporción para fluoroquinolonas, aminoglucósidos, y sensibilidad hacia los carbapenémicos. Además, se registró un predominio del gen bla$_{CTX-M}$ (69%), y una particular combinación de genes entre bla$_{CTX-M}$, bla$_{TEM}$, (25%) y ningún microorganismo con el gen bla$_{SHV}$. Pese a la elevada prevalencia de colonización, no se atribuye directamente a la práctica laboral en granjas avícolas, debido a que se trata de una portación asintomática de *E, coli* BLEE, dicho fenómeno hace referencia a reservorios compartidos en los cuáles el ser humano actúa como un vínculo (bacteria-animal). Asimismo, debido al contacto directo con las aves de corral y el uso de fármacos durante la cadena de producción de alimentos que están destinados al consumo humano, se considera una dinámica permanente de propagación de bacterias multirresistentes.

PALABRAS CLAVES: *ESCHERICHIA COLI, SALMONELLA SP., FÁRMACOS, AVES DE CORRAL, PREVALENCIA.*

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

"CHARACTERIZATION OF *ESCHERICHIA COLI* ESBL AND *SALMONELLA SP*. IN POULTRY FARM WORKERS OF ZONE 3"

Author: Escudero Heredia Steeven Patricio
Tutor: BqCl. Mg. Jaramillo Ruales, Evelyn Katherine
Date: Febrero, 2025

SUMMARY

The indiscriminate use of antibiotics in poultry farms promotes the emergence of resistant bacteria, such as ESBL-producing *Escherichia coli* and *Salmonella sp.*, throughout the poultry production chain, posing a significant public health risk due to their potential for zoonotic transmission. This research project aimed to characterize ESBL-producing *Escherichia coli* and *Salmonella sp.* strains in poultry farm workers in Zone 3 from September 2024 to February 2025, through a descriptive cross-sectional observational study. A total of 128 samples, including fecal and hand swabs from 64 workers, were analyzed. The results indicated an absence of *Salmonella sp.* colonization and a high prevalence of ESBL-producing *E. coli* (56%). The susceptibility profile showed low hydrolysis capacity for ceftazidime, moderate resistance to fluoroquinolones and aminoglycosides, and sensitivity to carbapenems. Furthermore, a predominance of the bla$_{CTX-M}$ gene (69%) was observed, along with a specific combination of bla$_{CTX-M}$ and bla$_{TEM}$ genes (25%), with no microorganisms carrying the bla$_{SHV}$ gene. Despite the high prevalence of colonization, it is not directly attributed to occupational practices in poultry farms, as it involves asymptomatic carriage of ESBL-producing *E. coli.* This phenomenon suggests shared reservoirs in which humans act as a link between bacteria and animals. Additionally, due to direct contact with poultry and the use of drugs throughout the food production chain intended for human consumption, there is a continuous dynamic of spreading multidrug-resistant bacteria.

KEYWORDS: *ESCHERICHIA COLI, SALMONELLA SP, POULTRY, DRUGS, PREVALENCE.*

INTRODUCCIÓN

Durante la última década, el uso indiscriminado de antibióticos, representa un desafió a nivel mundial en la práctica clínica. Esto se debe a procesos de adaptación y mecanismos de supervivencia de las bacterias ante la administración prolongada e innecesaria de medicamentos, evidenciado por el continuo desarrollo de resistencias antimicrobianas en microorganismos comensales[3]. En este aspecto, debido a uso de fármacos como parte de las estrategias de profilaxis para el crecimiento y prevención de enfermedades en aves de corral también se ha visto un ascenso en la prevalencia de enteropatógenos como *Escherichia coli* BLEE y *Salmonella sp,* en alimentos de origen animal [1,4]. Los principales mecanismos de resistencia presentes en estas bacterias Gram negativas son la producción de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) y betalactamasas tipo AmpC, las cuáles pueden propagarse mediante diseminación por plásmidos bacterianos favoreciendo la transmisión de la resistencia de animales hacia humanos (zoonosis) [4,5].

Desde el año 2012 en Europa se prohibió el uso cefalosporinas de espectro extendido en el sector avícola debido a los efectos secundarios en los animales y sus cuidadores. No obstante, numerosos estudios son foco de atención debido a la gran prevalencia de bacterias resistentes en pollos de engorde. Desde el 2016 en la Unión Europea se registran tasas de resistencia en *Escherichia coli* a ciprofloxacina, sulfametoxazol, ácido nalidíxico y tetraciclina en un 60% según el CDC (4). Asimismo, en España, se registran valores elevados de resistencia (70%) a tetraciclina y penicilinas. Por otro lado, a nivel del continente americano, en 2017, Estados Unidos reporta un descenso en los niveles de resistencia antibiótica en aves de corral con un 45% en estreptomicina, sulfametoxazol y tetraciclinas, a comparación del 78% de prevalencia de resistencia entre 2000-2015 [6].

En Latinoamérica, aislados bacterianos en granjas avícolas reflejan una elevada prevalencia de microorganismos resistentes, particularmente tipo BLEE/AmpC. A partir del año 2015, Colombia presentó un predominio de cepas bacterianas con genes productores de BLEE como bla$_{CTX-M}$ con un porcentaje de 65% en *E. coli* aviar [7]. Posteriormente en 2017, en Colombia y Brasil se identificó un ascenso en los registros de casos de genes AmpC-bla$_{CMY}$ (75%) en el sector avícola. No obstante, en 2020 en

Ecuador se presentaron elevados porcentajes (90.9%) de genotipos de β-lactamasas bla_{CTX-M} [8].

Por otro lado, de manera generalizada las aves de corral representan un 29% de las causas que propician el desarrollo de infecciones gastrointestinales en humanos. En estados Unidos a partir de la década de 1980 en adelante se ha identificado una mayor frecuencia de serovares de *Salmonella sp.* como: *S. typhimurium, S. enteritidis*, *S. Newport* y *S. heidelberg*, con un predominio de *S. enteriditis*, siendo la segunda causa de infección más frecuente en humanos. De igual forma, *S. heidelberg* forma parte de los cinco principales serotipos de microrganismos causantes de salmonelosis humana con la particularidad de provocar una infección invasiva [9], además es preocupante el posicionamiento de *Salmonella sp.* MDR como un problema de salud pública a nivel de la producción de alimentos de origen animal [10].

Biológicamente los seres humanos están conformados por poblaciones bacterianas en superficies y cavidades internas que forman parte funcional del organismo, sin embargo, factores externos, como el medio ambiente, la dieta, y exposición a focos infecciosos, pueden alterar dicha composición bacteriana. Cabe destacar que la presencia de estos microorganismos en la microbiota gastrointestinal presentan un equilibrio dinámico que ante el descenso del sistema inmunitario, terapías antibióticas de larga duración, contacto diario con animales y sus desechos, pueden alterar dicha asociación biológica desarrollando patologías como infecciones gastrointestinales, enfermedades inflamatorias intestinales, entre otras[11]. De modo que, es imprescindible el estudio microbiológico y molecular de enteropatógenos multirresistentes en trabajadores de granjas avícolas para determinar el nivel de colonización bacteriana e identificar los posibles factores de riesgo que desencadenan esta problemática [12].

JUSTIFICACIÓN

La resistencia a los antibióticos se presenta como una problemática de salud pública, con una proyección mundial de muertes de hasta 10 millones de personas por año en el 2050 [8]. Esto se debe a la rápida propagación de microorganismos capaces de inhibir el efecto farmacológico de los antibióticos como consecuencia de las adaptaciones bacterianas (evolución genética natural). Por consecuente se ha visto un declive en la eficacia de los tratamientos y el desarrollo de complicaciones clínicas [3].

Durante los últimos años, el aumento de la resistencia antimicrobiana, está asociada al uso inadecuado de fármacos en la práctica clínica y en la producción de alimentos de origen animal. En América Latina este fenómeno ha presentado un ascenso significativo de hasta 160% debido al rápido posicionamiento de la industria avícola. Tal es el caso de Ecuador, en que la carne de ave es la principal fuente de proteína de consumo humano, aproximadamente 30,14 kg/año [13]. Además de un mayor nivel de producción avícola en la provincia de Tungurahua perteneciente a la Coordinación Zonal Centro 3, con 58 granjas avícolas ubicadas en los cantones: Ambato, Tisaleo, Pelileo, Pillaro, Quero y Baños, según registros del 2020 del Ministerio de Agricultura y Ganadería [14].

Escherichia coli (*E. coli*) y *Salmonella sp.* son bacilos Gram negativos emergentes en la cadena de producción de alimentos, debido a su potencial zoonótico de transmisión y el desarrollo de enfermedades gastrointestinales en seres humanos. Esto se debe a la supervivencia y crecimiento en el ambiente natural, cuyas vías principales de transmisión de estos patógenos son: agua, alimentos, heces, desechos animales y residuos de aguas de mataderos en el sector agropecuario [1,4].

En bacterias Gram negativas uno de los principales mecanismos de resistencia son las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), las cuáles inactivan el accionar de antibióticos de amplio espectro como cefalosporinas de tercera generación. En este sentido en Ecuador se presenta un predominio del gen bla$_{CTX\text{-}M}$ (90,9%) en cepas de *E. coli* y fenotipos de *Salmonella* MDR como *S. infantis* en un 91,4% [4,8]. Por lo que denota un mayor interés el estudio de estos microorganismos y sus determinantes de resistencia bacteriana [8].

En busca del bienestar de los seres vivos, el Ministerio de Salud Pública apoyado por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) promueven el desarrollo de un Programa de Entrenamiento en Epidemiología de Campo (FETP) con enfoque One Health en Ecuador. Este hace referencia a las estrategias de salud pública para mejorar la red de vigilancia epidemiológica en el país, encaminadas en el cuidado de la salud de humanos, animales y el entorno que los rodea (medio ambiente), cuya finalidad sea responder de manera oportuna ante situaciones de brotes y epidemias [15,16].

De este modo, este proyecto propone la caracterización de *Escherichia coli* BLEE y *Salmonella sp.* en trabajadores de granjas avícolas de la Zona 3 con el fin de identificar si existe colonización de microorganismos bacterianos resistentes a los antibióticos en la población mencionada. Además, de analizar los patrones de resistencia a los antibióticos en enteropatógenos bacilo Gram negativos, y la caracterización de los genes de resistencia de mayor relevancia. Enfocándose en la comprensión de la situación epidemiológica, énfasis en la toma de medidas de optimización del uso de antimicrobianos y precautelar la salud/integridad del personal de las industrias de producción de alimentos.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

La investigación contribuye al diseño de estrategias que serán implementadas en la práctica clínica como parte de los avances científicos. En este contexto, varios estudios reportan la diseminación de microorganismos resistentes a los antimicrobianos haciendo énfasis la emergente aparición de bacterias como *Escherichia coli, Salmonella sp. y Enterococcus* multirresistentes, como consecuencia del uso de antibióticos en la industria avícola, representado un gran riesgo para la población consumidora de alimentos de origen animal. De esta manera, dichos reportes representan una panorámica de la problemática de salud pública actual en Latinoamérica y el mundo [17].

La propagación de este tipo de microorganismos en la población depende de factores externos, prácticas laborales y condición de salud de los seres vivos, por lo que Guerra y colaboradores (2022), en su artículo original "Diseccionando comunidades microbianas y resistomas para interconectar humanos, suelo y ganado" explican que las granjas de producción animal son consideradas reservorios de microorganismos multirresistentes. Su estudio se centra en la investigación del microbioma intestinal en los animales y trabajadores una granja avícola y un matadero en China, cuyo escenario fue motivo de preocupación debido a la gran variedad de genes de resistencia detectados. Por otro lado, a *Escherichia coli* se le considera como un indicador en la vigilancia epidemiológica de RAM en granjas, debido a su elevada prevalencia, De esta forma, al menos 506 pares de cepas humano-pollo de *E. coli* presentaron genes de resistencia similares (96%), siendo el microorganismo más frecuentemente [18].

De igual forma, Tofani et al., (2022) en su estudio "Evaluación de la carga, la virulencia y los rasgos de resistencia a los antibióticos de E. coli ESBL/AmpC de pollos de engorde criados en granjas convencionales, sin antibióticos y orgánicas" establecen que *E. coli* es el principal patógeno hallado en aves de corral con AmpC mediada por plásmidos (pAmpC) y producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Esta última siendo la más relevante datando un predominio del gen

bla$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ (42,7%), bla$_{TEM}$ (29%) y bla$_{SHV}$ (19,8%) en granjas convencionales. Además cabe destacar que bla$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ se encuentra en plásmidos conjugativos asociándose a otros genes como bla$_{CTX\text{-}15}$ con una mayor difusión global, sumado a la presión selectiva por antimicrobianos usados previamente [19].

A nivel nacional el siguiente estudio titulado "Caracterización de *Escherichia coli* resistente a cefotaxima aislada de granjas de pollos de engorde en Ecuador" de Vinueza et al., (2020), evaluó los patrones de resistencia antibiótica y caracterización de genes productores de BLEE y AmpC en granjas avícolas ecuatorianas. Se emplearon técnicas fenotípicas para la identificación de la susceptibilidad a los antibióticos (difusión en disco) y técnicas genotípicas (PCR y secuenciación) para la identificación del componente genético. De este modo, a partir de 176 aislados se detectaron un 97,4 % de AmpC y 94,3 % de BLEE, este último con un predominio del gen bla$_{CTX\text{-}M}$ (90,9 %) demostrando que la industria avícola ecuatoriana presenta una elevada prevalencia de microorganismos resistentes en aves debido al uso excesivo de antimicrobianos [8].

Sin embargo, hay que tener en cuenta que a pesar del uso de antibióticos en el sector avícola como aminoglucósidos en gran proporción y dependiendo de la ubicación geográfica por la variación de la temperatura, es decir, uso de penicilina durante el verano y anfenicol durante la primavera. La resistencia detectada sobre las otras familias de antibióticos se debe a una selección indirecta de estos genes de resistencia y al proceso de diseminación por elementos genéticos móviles [18].

Por lo que Moser y colaboradores (2018), en su estudio "El papel de los elementos genéticos móviles en la propagación de *Escherichia coli* resistente a los antimicrobianos de pollos a humanos en operaciones avícolas de producción a pequeña escala en las zonas rurales de Ecuador" determinan la relación entre la propagación de bacterias resistentes mediante la transferencia de información genética a través de plásmidos bacterianos y transposasas asociadas con integrones (*int1*) identificando una elevada probabilidad de presentar integrones con genes de resistencia en humanos (OR ajustado = 2,0; intervalo de confianza (IC) del 95 %: 1,06, 3,83) debido a su interacción con aves bajo suministro de antibióticos [20].

En este aspecto, para comprender de mejor forma el papel de los elementos genéticos móviles en el creciente desarrollo de resistencia a los antimicrobianos. Van Hoek y colaboradores (2018), en su investigación "Estudio longitudinal de la presencia de *Escherichia coli* ESBL en una granja de pollos de engorde orgánicos" determinaron el impacto de la expansión clonal y transferencia horizontal de genes de resistencia en la industria avícola mediante la tipificación de genes BLEE y caracterización genética de plásmidos a partir de muestras de pollos de engorde. Así que aseguran que la rápida propagación de este mecanismo de resistencia no se debe a la diseminación en particular de un clon de *E. coli* ya que se trata de una transferencia horizontal del plásmido *IncI1*/ST3, el cuál transporta el gen bla$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$, presente en gran parte de todos los aislamientos bacterianos en estudio [21].

Además el ambiente, métodos de crianza de los animales y factores externos intervienen de manera directa en la aparición de resistencias a los antibióticos en animales y humanos, por ello, Koga, et al., (2015), en su artículo "Comparación de factores de virulencia y resistencia a los antibióticos entre *Escherichia coli* aislada de aves de corral convencionales y criadas al aire libre" asilaron y caracterizaron 156 cepas de *Escherichia coli* a partir de aves de corral con sistemas de producción convencional (industria avícola) y criadas al aire libre, detectando una baja proporción de factores de virulencia en aves criadas al aire libre (28,6%) a diferencia del sistema de producción industrial (75,2%); de este último se identificaron genes de resistencia del cual se destaca un elevado porcentaje de cepas productoras de BLEE (42,1%) con un predominio de 62,5% del gen bla$_{CTX\text{-}M}$ [7].

No obstante, la gestión del personal a cargo de las granjas avícolas se ha visto en la necesidad de establecer estrategias de intervención durante la producción de pollos de engorde para mitigar el desarrollo de resistencias a los antibióticos. Becker et al., (2021), en su revisión "¿Existen medidas de intervención efectivas en la producción de pollos de engorde frente a *Escherichia coli* productora de ESBL/AmpC ?", resumen las medidas tomadas en contra de la aparición de microrganismo multirresistentes como *E. coli.* En primera instancia, aseverando que el proceso de limpieza y desinfección de las áreas de trabajo es crucial. Se identificaron los beneficios de un tratamiento probiótico como Aviguard usado para reconstituir o mantener estable la flora bacteriana de los animales. Cuyo estudio reflejo un descenso significativo entre

de 4-5 log $_{10}$ UFC/g de excreción cecal, por ende, una reducción de la colonización y transmisión de *E. coli* en las aves [22].

Como parte de la aparición de microrganismos multirresistentes en la industria avícola en el año 2017 Liljebjelke et al., en su revisión: "Diversidad de fenotipos de resistencia a los antimicrobianos en *Salmonella* aislada de granjas avícolas comerciales" analizaron datos de un estudio retrospectivo acerca de *Salmonella sp.* resistente a antimicrobianos describiendo 25 fenotipos de resistencia, de los cuales se destaca un predominio de 36,3% de resistencia hacia la estreptomicina, con una relación a la sulfadimetoxina asociada a la presencia del transposón tn21 en estos microorganismos aislados en dos granjas comerciales cuya transmisión vertical de genes de resistencia es evidente [23].

Asimismo, Zeng y colaboradores exponen en su estudio "Prevalencia y persistencia de *Salmonella* en mataderos avícolas industrializados", las principales vías de contaminación de *Salmonella sp.* en los rebaños de aves de corral, producto de un ineficaz proceso de limpieza y desinfección de los rebaños de aves sacrificadas (contaminación cruzada), reflejando un 16,1% de *Salmonella sp.* posteriormente del proceso de desplumado de las aves y 23 % después del enfriamiento, cuyo serotipo más frecuente fue *S. infantis,* además de un falso estado de negatividad de *Salmonella sp.* en aguas de enfriamiento en las líneas de sacrifico de los animales promueven la prevalencia de estos microorganismos bacterianos durante la línea de procesamiento avícola [24].

Se han caracterizado en el componente animal *Salmonella sp.* como parte de la vigilancia epidemiológica de microorganismos resistentes a los antibióticos en industrias productoras de alimentos a base de animales. Wang y colaboradores (2020), caracterizaron *Salmonella sp.* en pollos en China Central, con un predominio del serotipo *S. pullorum* con un 43,9% en pollos enfermos y 46,6% en pollos aparentemente sanos. La mayor tasa de resistencia se registra contra ampicilina (97,6%), 58,3% para tetraciclina y 51,2% para colistina. Sin embargo, *S. enteridtis* representa el serotipo más alarmante (multirresistente) por sus elevados niveles de resistencia a colistina, ciprofloxacina y meropenem [25].

Cardoso et al., (2024), en su investigación en granjas comerciales de gallinas ponedoras en el centro-oeste de Brasil, evaluaron perfiles de resistencia a los antibióticos en aislamientos de *Salmonella sp.* Se identificó un elevado porcentaje de resistencia a sulfametoxazol (91%) y sulfonamidas (51%), con la particularidad de que *Salmonella Johannesburg y Salmonella Corvallis* únicamente registraron resistencia a sulfametoxazol, mientras que para ciprofloxacina no se registraron cepas resistentes. Asimismo, como parte del estudio molecular se corroboró los resultados de la caracterización fenotípica, hallando genes *intl*1 y *sul*1 en gran parte de los serovares testeados y ausencia del gen bla$_{TEM}$ [10].

En un estudio realizado en cepas de *Salmonella entérica* en granjas avícolas ponedoras en el centro de Ecuador, Sanchéz et al., (2019), evaluaron el perfil de resistencia antimicrobiana, agrupando en 9 clados taxonómicos de acuerdo al fenotipo presente. El fenotipo más relevante fuel el MDR en cepas de *S. infantis* en un 94,4% (17 de 18 cepas). En este caso se destaca debido a la coexistencia del fenotipo BLEE (CTX-M-65) y genes de resistencia *tet*A y *sul*1 en *S. infantis* en su mayoría en hisopados de estiércol y muestras de alimento. Se destaca como ruta potencial de infección la posible contaminación cruzada entre el sitio de alojamiento de las aves y su alimento induciendo el ingreso de bacterias multirresistentes en la cadena de producción alimentaria [4].

Por otro lado, la cadena de producción de alimentos se ve afectada debido a la contaminación de los alimentos para aves de corral, representando una fuente principal de infecciones por *Esherichia coli* y *Salmonella sp*. Gakii, Kebira & Ombori (2021) en su estudio, determinaron la carga bacteriana de los enteropatógenos mencionados, la cual oscilaba entre $3{,}1 \times 10^5$ y $3{,}0 \times 10^6$ ufc/g. Al mismo tiempo, se identificó la presencia de *E. coli* en un 58% y 28% de *Salmonella sp.* en un total de 150 muestras de alimento procesadas. En dichos aislamientos se registraron resistencias hacia betalactámicos, aminoglucósidos y sulfonamidas. La resistencia hacia la ampicilina fue la más relevante con un 41% para *Salmonella sp. y* 62% para *E. coli.,* este tipo de fenotipos hacen alusión a la presencia de genes bla$_{SHV}$ y bla$_{TEM}$ caracterizados como parte del estudio de betalactamasas de espectro extendido BLEE [26].

Es evidente como la cadena de producción alimentaria es una de las principales fuentes de transmisión de genes de resistencia a los antibióticos debido a la ingesta de carne

contaminada y contacto directo con animales destinados al consumo humano, presentados como reservorios compartidos de genes BLEE con la población humana. En este sentido la enzima CTX-M-15 coexiste en seres humanos y productos agroalimentarios, la cual al ubicarse en plásmidos específicos confiere resistencia a aminoglucósidos y fluoroquinolonas. Además, en infecciones bacterianas mediadas por estos mecanismos de evasión inducen el desarrollo de resistencia a ampicilina y a trimetoprima-sulfametoxazol en seres humanos [27].

Falgenhauer y colaboradores (2019), determinaron la epidemiología molecular de *E. coli* BLEE procedente del tracto intestinal de humanos y aves de corral. A partir de muestras de 140 pollos de engorde y 54 niños hospitalizados en el sector rural de Ghana entre enero y junio del 2015 se identificaron 29% y 61% de aislados de *E. coli* productora de BLEE respectivamente con un predominio del gen bla$_{CTX\text{-}M\text{-}15}$. La particularidad del caso es que dichos pacientes mantuvieron contacto directo con gallinas en sus viviendas, estaban sujetos a una dieta habitual a base de carne de ave y no manejaban prácticas de higiene personal, reflejando una asociación directa entre ambas poblaciones [28].

Primeau et al., (2023), en su estudio realizado en Canadá hicieron una caracterización molecular de los genes productores de BLEE en especies animales para consumo y seres humanos. En cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella sp.* la combinación de genotipos bla$_{TEM/CMY\text{-}2}$ se detectó *con* mayor frecuencia, 64% y 74,5% respectivamente. Sin embargo, la prevalencia de *Salmonella sp.* en humanos fue baja 0,4% en comparación de otros países como Alemania. Esto se debe a la implementación de prohibiciones nacionales para evitar el uso de antibióticos de amplio espectro en la práctica avícola, reduciendo significativamente la aparición de bacterias multirresistentes en animales y humanos[27].

En países en vías de desarrollo como Ecuador, las granjas de pollo aún son consideradas una importante reserva de bacterias multirresistentes, Vinueza et al., (2020), como parte de su estudio de caracterización de *Escherichia coli* resistente a cefotaxima en granjas de Ecuador, se registró un 48,3% de *E. coli* resistente a cefalosporinas de tercera generación con un predominio de la familia bla$_{CTX\text{-}M}$, *siendo* bla$_{CTX\text{-}M8}$ el gen que presentaron tanto muestras de humanos como carne de ave. Además, en la práctica avícola es común el uso fluoroquinolonas en las aves de corral

como profilaxis y la administración de ciprofloxacina como tratamiento empírico en humanos por infecciones bacterianas, se consideraría una posible cotransferencia de genes de resistencia en ambas poblaciones en estudio [8].

1.2 FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

1.2.1 *Escherichia coli*

Es una bacteria Gram negativa en forma de bastón alargado, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, habitualmente presente en la microbiota gastrointestinal de humanos y animales. Asimismo, está distribuida en el entorno y medio ambiente, como aguas residuales por lo que, es considerado un indicativo de contaminación fecal. De igual forma, ante el declive del sistema inmunitario, alteración de la flora bacteriana y administración prolongada de antibióticos es capaz de convertirse en un microorganismo oportunista responsable del desarrollo de patologías gastrointestinales y colonización [29].

1.2.2 Salmonella sp.

Es un microorganismo bacteriano, bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo intracelular, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. *Salmonella sp.* es causante de enfermedades diarreicas como: infecciones gastrointestinales, salmonelosis humana y fiebre entérica, a consecuencia del consumo de alimentos de origen animal contaminados. Particularmente está presente en la carne de ave y huevos como principal fuente de infección en la cadena de producción y suministro de alimentos [30].

1.2.3 *Escherichia coli* BLEE y *Salmonella sp.* en granjas avícolas

La industria de producción de alimentos de origen animal representa la principal fuente de aporte nutricional para los seres humanos, como la carne de ave. Sin embargo, el recurrente uso de antimicrobianos en los animales como prevención del desarrollo de enfermedades y profilaxis para potenciar el crecimiento. Esto está relacionado con la aparición de enteropatógenos multirresistentes como *Escherichia coli* y *Salmonella sp.* en aves, cerdos y bovinos [1,4]. La transmisión de este tipo de microorganismos está dada de manera directa tras la ingesta de la carne contaminada, induciendo el desarrollo de infecciones gastrointestinales. En este contexto, se presentaran

modificaciones genéticas a la flora bacteriana del individuo debido a la adquisición de genes de resistencia por parte de la microbiota intestinal [2,9].

1.2.4 Aislamiento e identificación bacteriana

Cultivo

El aislamiento de bacterias Gram negativas se realizan en medios de cultivo selectivos/diferenciales que permitan delimitar la población bacteriana de interés [31]. De esta forma, se describen los siguientes medios usados con frecuencia para el aislamiento de enteropatógenos:

- **Agar Eosina Azul de Metileno (EMB):** Medio de cultivo selectivo, con componentes nutritivos como peptona que favorece el desarrollo bacteriano. Además, permite la diferenciación de bacterias fermentadoras de lactosa y/o sacarosa mediante indicadores de eosina y metileno. Estos forman un complejo que inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas. De esta forma las cepas que son capaces de fermentar lactosa tienen una tonalidad oscura y en la superficie azuladas o rosadas. Asimismo, tienen la particularidad de presentar una apariencia metálica brillante para el crecimiento de colonias de *Escherichia coli* y *Citrobacter spp*. [32]
- **Agar Xilosa – Lisina – Desoxicolato (XLD):** Medio de cultivo específico para el crecimiento de enteropatógenos como *Salmonella* y *Shigella* gracias a la presencia de desoxicolato de sodio. De igual forma, se puede evidenciar la fermentación de Xilosa con producción de ácido, pues en el caso de *Salmonella* le permite la descarboxilación de la lisina presente en el medio, elevando el pH. De este modo, por reducción del tiosulfato favorece la producción de H_2S visualizándose de una tonalidad negra en el centro de las colonias y por descarboxilación de la lisina se tornan de color rojizo purpura [33].

Pruebas bioquímicas

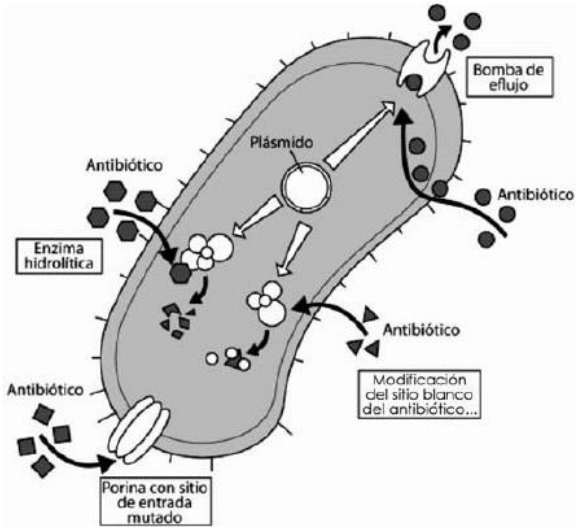
La identificación de los microrganismos bacterianos es realizada mediante el uso de medios de cultivo con composición específica que permitan diferenciar las vías metabólicas y requerimientos nutricionales:

- **Agar TSI:** Compuesto por 3 azúcares: lactosa, sacarosa y glucosa. Permite la diferenciación de bacterias fermentadoras y no fermentadoras de carbohidratos mediante un indicador de pH, es decir, ante la fermentación de carbohidratos, se acidificará el medio (amarillo), o a su vez se alcalinizará (rojo) en ausencia de fermentación [34].
- **Urea:** Permite identificar a microorganismos que poseen la enzima ureasa en su composición, la cuál es detectada mediante una reacción de hidrólisis de la urea, liberando moléculas de amoniaco y CO_2. De este modo, incrementa el pH del medio de cultivo y por acción del rojo de fenol, el medio se torna de color rojizo [34].
- **Citrato:** Determina la capacidad de las bacterias de usar el citrato de sodio como única fuente de carbono en sus vías metabólicas. El viraje de color en esta prueba se a través de la variación de pH y acción de un indicador (azul de bromotimol) [34].
- **SIM:** Mediante la turbidez del medio se identifica la motilidad del microorganismo. Además, permite detectar la actividad del triptófano sobre el triptófano para la producción de indol. Esto es posible con la adición de un reactivo de benzaldehído. Finalmente, en caso de producir H_2S el medio se oscurecerá debido a la producción del ácido a base de metales pesados [34].
- **RM:** Denota la capacidad de los microorganismos de formar productos ácidos mediante la metabolización de glucosa. Es visualizada con el cambio de tonalidad del medio por acción de un indicador de pH (rojo de metilo) [34].

1.2.5 Resistencia a los antibióticos

Es la capacidad de los microorganismos bacterianos para inhibir la actividad farmacológica del antibiótico. Este fenómeno representa un fracaso terapéutico debido al desarrollo de complicaciones clínicas, induciendo un aumento significativo de la mortalidad y morbilidad en los seres vivos. Uno de los principales mecanismos de resistencia es la producción de enzimas hidrolíticas, las cuáles destruyen el centro activo del antibiótico inactivando su accionar sobre la bacteria [35].

***Gráfico 1**. Mecanismos de resistencia antimicrobiana*



Fuente: Moreno C, González R & Beltrán C.[36]

Entre las más representativas están: las betalactamasas de espectro entendido (BLEE), betalactamasas tipo AmpC y carbapenemasas [35]. Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas hidrolíticas responsables de la destrucción del anillo betalactámico de antibióticos de la familia de los betalactámicos, principalmente cefalosporinas de tercera generación como: ceftriaxona, cefotaxima y ceftazidima [35].

Se describen las primeras enzimas BLEE en el año 1980, a las de tipo TEM y SHV, con potencial hidrolítico para penicilinas y oximinopenicilinas, pero limitada acción para cefamicinas y carbapenémicos. A las de tipo SHV se le asocia su origen a la penicilasa cromosómica SHV-1 de *Klebsieela pneumoniae* con un grado de similitud >90% en su secuencia de aminoácidos [37]. El tipo de enzimas en SHV y TEM varía de acuerdo a la ubicación de los residuos de aminoácidos presentes, por ejemplo, la hidrolisis de ceftazidima es posible por la ubicación del residuo de serina en la posición 238 en enzimas tipo SHV. Por otro lado, las betalactamasas tipo CTX-M hacen alusión a su nombre debido al efecto de hidrolisis de cefotaxima e incluso cefalosporinas de uso veterinario como ceftiofur y cefquionona [38].

1.2.6 Susceptibilidad antimicrobiana

El perfil de susceptibilidad bacteriana está determinado de acuerdo a la respuesta de adaptación bacteriana frente a la administración de fármacos. Por lo que se evalúa su actividad in vitro de acuerdo a la concentración mínima inhibitoria, a partir de la cual

el microorganismo ya no es capaz de multiplicarse. Para su estudio a nivel de laboratorio, se mide la concentración mínima inhibitoria de un antibiótico en específico, es decir, la concentración ante la cual un microorganismo ya no es capaz de sobrevivir y seguir multiplicándose [35]. Este parámetro permite cuantificar la sensibilidad a los antibióticos testeados mediante técnicas fenotípicas como gradientes de difusión, dilución en medios líquidos y en medios sólidos.

Antibiograma

Permite evaluar la susceptibilidad de los microorganismos a través de la difusión de discos de antibióticos en agar. Se basa en la inhibición del crecimiento bacteriano de la cepa en estudio alrededor de un disco cargado de una concentración específica de antibiótico que difunde en el medio sólido (Agar Müller Hinton). Cabe destacar que las cepas bacterianas deben ser ajustadas a una escala McFarland 0.5 como parte de los estándares de referencia establecidos para la prueba, en base al número de bacterias por mililitro [39,40].

Una vez el microorganismo haya crecido en la superficie del agar, se formarán halos de inhibición, dependientes del grado de sensibilidad de la bacteria ante el fármaco usado. Por consiguiente, los halos formados deben ser medidos y examinados de acuerdo a directrices establecidas por Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) en Latinoamérica y European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) en Europa. Esta técnica no evalúa de manera cuantitativa la correlación diámetro/CIM, por lo que, se usan puntos de corte que determinan que un microorganismo es resistente cuando tiene un menor halo de inhibición, sensible con un mayor tamaño del halo e indeterminado en un rango de ambos diámetros [39,40].

Pruebas de laboratorio para detección de BLEE

- **Sinergismo con un inhibidor:** El CLSI recomienda la realización de test de sinergia con un inhibidor para identificar BLEE en enterobacterias. Para lo cual en una placa de Agar Müller Hinton se inocula la suspensión bacteriana de la cepa en estudio a una escala McFarland 0.5. De este modo, se trata de evaluar la actividad de la enzima hidrolítica frente a la exposición de un inhibidor de betalactamasas (ácido clavulánico) combinado con una aminopenicilina (Amoxicilina) AMC, cefalosporinas de tercera/cuarta generación y un

monobactámico. En este caso, se evidencia con la ampliación del halo de inhibición de las cefalosporinas hacia el inhibidor (AMC), debido al sinergismo producido entre antibióticos [40].

- **Difusión con doble disco:** Método adicional confirmatorio de BLEE establecido por el CLSI, bajo las mismas condiciones de inoculación de la bacteria como la prueba anterior. El cual consiste en comparar la diferencia de halos de discos combinados entre una cefalosporina más un inhibidor de betalactamasas ya sea cefotaxima/ac. clavulánico o ceftazidima/ac. clavulánico (30ug) con respecto a discos no combinados como ceftazidima (30ug). Se considera una cepa productora de BLEE si la diferencia del halo de inhibición de los discos combinados es mayor a 5mm en comparación a los discos con un solo antibiótico [40].

1.2.7 Caracterización genotípica de genes BLEE

La producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) se dan por la expresión de genes de resistencia codificados en el genoma bacteriano o adquiridos por transferencia genética horizontal (plásmidos bacterianos). Entre los genes BLEE más representativos se encuentra: bla$_{CTX-M}$, bla$_{SHV}$ y bla$_{TEM}$. Los cuales como parte del estudio microbiológico e investigativo son amplificados mediante técnicas moleculares como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y detectados por electroforesis [41].

Extracción de ADN mediante shock térmico

Separación del material genético mediante la lisis de membrana/ pared celular del microorganismo bacteriano, para la liberación de los ácidos nucleicos. Se suelen ocupar buffers como buffer TE/TAE que mantengan la integridad del ADN impidan el funcionamiento de las DNAsas, ya que al contener EDTA en su composición forman un complejo de iones de Mg^{2+} que inactivan el accionar de las enzimas, además estabilizan el pH de la reacción. Consecuentemente las proteínas y material fibroso es separado mediante centrifugación [42,43].

Las bacterias Gram negativas poseen una delgada membrana que facilita el proceso de extracción de ADN. Por lo que es factible el uso de métodos químicos, como el shock

térmico, basado en la variación de temperatura, es decir, el microorganismo se expone a dos ciclos de incubación a elevadas temperaturas (95°C) y una baja temperatura de -20°C. La incubación puede ser realizada en conjunto con la adición de proteínasa K o lisozima para un mejor proceso de lisis celular. Esto permite la separación de ácidos nucleicos mediante la ruptura de membranas y separación de proteínas [42,43].

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es considerada como la prueba Gold standard para la identificación de mecanismos de resistencia en microorganismos bacterianos. Uno de los más frecuentes es la identificación de genes productores de enzimas hidrolíticas como: betalactamasas y carbapenemasas. Se basa en una reacción enzimática que permite generar un millón de copias de un fragmento específico de ADN. La amplificación del material genético se rige bajo la propiedad de la replicación celular [41,42].

El procedimiento está dividido en 3 etapas: desnaturalización. hibridación y elongación. Inicialmente es separada la doble cadena de ADN (desnaturalización mediante la ruptura de puentes de hidrógeno a elevadas temperaturas (95°C) durante un tiempo aproximado de 20-30 segundos. Esto dependerá de la cantidad de guanina y citocina presente en la muestra. Una vez separadas las cadenas de ADN los cebadores (secuencias cortas de ADN) se hibridarán o alinearán a la cadena madre. La temperatura en esta fase de la reacción descenderá de 50-60 °C durante 40-45 segundos. En la elongación, la enzimática Taq Polimerasa añadirá nucleótidos complementarios (dNTP's) para el ensamblaje de cadenas completas de ADN a una temperatura de 72 °C. Los productos de la amplificación deberán ser sometidos a un proceso de electroforesis para la identificación de los genes en estudio [42,44].

Electroforesis

Se realiza el revelado de los productos de la PCR mediante la separación de los fragmentos de ADN amplificados en base a su peso molecular (pb). Esto se lleva a cabo sobre una matriz porosa (gel de agarosa) en un campo eléctrico [41]. La agarosa es un compuesto polisacárido derivado del agar, altamente purificado que permite la migración de ácidos nucleicos dependiendo del grado de densidad. A su vez, se

producen una reorientación de las moléculas ante el cambio de dirección del campo eléctrico sobre el cual se posiciona la matriz porosa [41,42].

Los determinantes de la duración de los pulsos eléctricos son: tamaño molecular, intensidad y ángulo del campo eléctrico, los cuales ayudan a determinar el rango de separación molecular. Para mantener las muestras sobres los pocillos de agarosa, se añade un buffer de carga con glicerol, el cual le confiere una consistencia densa y estabilidad del pH para la reacción. Además, se usa un agente intercalante como el sybersafe para facilitar la visualización de la migración de las moléculas sobre la matriz porosa, mediante la emisión de fluorescencia [41,42].

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar cepas de *Escherichia coli* BLEE y *Salmonella sp.* en trabajadores de granjas avícolas de la Zona 3.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar cepas de *Escherichia coli* BLEE y *Salmonella sp.* mediante métodos fenotípicos de microbiología convencional en los trabajadores de las granjas avícolas.
- Determinar la susceptibilidad a los antibióticos en cepas de *Escherichia coli* BLEE y *Salmonella sp.* mediante técnicas convencionales.
- Caracterizar los genes productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en *Escherichia coli* mediante biología molecular.
- Asociar los factores de riesgo con la presencia de *Escherichia coli* BLEE y *Salmonella sp.* en los trabajadores de las granjas avícolas.

CAPITULO II

METOLOGÍA

2.1 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

2.1.1 Humanos

Autor del trabajo de investigación: Escudero Heredia Steeven Patricio.

Tutor del trabajo de investigación: BqCl. Mg. Jaramillo Ruales Evelyn Katherine

Población total: 64 trabajadores de granjas avícolas.

2.1.2 Institucionales

- Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Bacteriológicos UTA-LABB.
- Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Técnica de Ambato.
- Biblioteca de la Universidad Técnica de Ambato.

2.1.3 Materiales

- Hojas de papel bond.
- Laptop.
- Marcadores.
- Esferos.
- Recipientes para toma de muestra de heces.
- Hisopos de madera con punta de algodón.
- Tubos de vidrio con tapa
- Frasco de alcohol al 70%
- Cajas monopetri y bipetri de plástico en paquetes estériles de 90x15 cm.
- Agar EMB
- Agar XLD
- Agar Müller Hinton
- Agua peptonada
- Puntas de 0.5-10 uL
- Puntas de 10-200 uL

- Puntas de 1000 uL
- Tubos 0.2 uL
- Buffer TE
- Buffer TAE
- Enzima Taq polimerasa en super master Mix
- Primers
- Syber Safe
- DNA Ladder
- Agarosa

2.1.4 Reactivos

- Discos de susceptibilidad antimicrobiana OXOID
- Kit de reactivos para PCR: Go taq Green Master Mix-Promega.

2.1.5 Equipos

- Autoclave
- Refrigerador
- Cámara de flujo laminar
- Incubadora
- Termociclador Bio-RAD T100
- Vortex
- Cámara de Electroforesis
- Fotodocumentador ChemiDoc Bio-Rad.
- Centrífuga.
- Microcentrífuga.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Nivel o tipo de investigación

Investigación observacional de tipo descriptiva trasversal

2.2.2 Enfoque de la investigación

El presente trabajo posee un enfoque mixto, en el cual se realizó de manera cualitativa la identificación de enteropatógenos multiresistentes como *Escherichia coli* BLEE y *Salmonella sp.* a través de microbiología convencional como cultivos bacteriológicos, antibiogramas y pruebas de sinergismo. Además, fueron caracterizados los genes productores de BLEE mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis. Asimismo, se describieron los factores de riesgo de colonización de los microrganismos descritos, los cuáles fueron analizaron e identificados con la realización de una encuesta en la población de estudio. Por otro lado, es cuantitativo ya que los resultados obtenidos de los microorganismos reportados (fenotípicamente/genotípicamente) y las respuestas de la encuesta realizada fueron tabulados para un análisis estadístico final.

2.3 SELECCIÓN DEL ÁREA O ÁMBITO DE ESTUDIO

2.3.1 Campo y área

Campo amplio: Salud y Bienestar; Campo específico: Salud; Área: enfermedades infecciosas

2.3.2 Delimitación Temporal

La investigación fue realizada durante el período septiembre 2024 – febrero 2025, período académico de la Universidad Técnica de Ambato.

2.3.2 Delimitación Espacial

El proyecto de investigación estuvo enfocado en trabajadores de 3 granjas avícolas de la Zona 3.

2.4 POBLACIÓN Y MUESTRA

La población de estudio fueron los trabajadores de granjas avícolas de la Zona 3, a partir de la cual se seleccionó una muestra por conveniencia. Esta estuvo compuesta por todos los empleados de la granja, divididos en dos grupos: el grupo experimental y el grupo control. El grupo experimental estará formado por los trabajadores que tienen contacto directo con el cuidado y manejo de las aves de corral, mientras que el

grupo control estará compuesto por los trabajadores administrativos, quienes no tienen contacto directo con las aves.

2.5 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

2.5.1 Grupo Experimental

Criterios de Inclusión:

- Trabajadores con contacto directo en el cuidado y manejo de aves de corral.
- Personal de limpieza involucrado en la manipulación de excrementos y desechos de aves.
- Empleados con un período de trabajo continuo de 15 días en la empresa.

Criterios de Exclusión:

- Personal de ventas de la producción avícola sin contacto directo con aves o sus desechos.
- Trabajadores que hayan recibido tratamiento antibiótico durante el período de la investigación.
- Empleados que se encuentren en período de vacaciones o con permisos prolongados (indefinidos) durante el tiempo de estudio.

2.5.2 Grupo Control

Criterios de Inclusión:

- Personal administrativo sin contacto directo con aves o sus desechos.
- Trabajadores que no realicen actividades de avicultura fuera de la empresa.
- Empleados con un período de trabajo continuo de 15 días en la empresa.

Criterios de Exclusión:

- Trabajadores con contacto directo en el cuidado y manejo de aves de corral.
- Trabajadores con acceso a áreas de procesamiento y almacenamiento de los productos avícolas.
- Empleados que se encuentren en período de vacaciones o con permisos prolongados (indefinidos) durante el tiempo de estudio.

2.6 VARIABLES DE LA INVESTIGACIÓN

La operacionalización de las variables será descrita a detalle en el ***Anexo 2.***

- **Variable dependiente:** Presencia de cepas de *Escherichia coli* BLEE *y Salmonella sp.*
- **Variables independientes:**
    - Susceptibilidad Antimicrobiana.
    - Genes productores de BLEE en cepas de *E. coli.*
    - Factores de riesgo.

2.7 MÉTODOS DE RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN

Se socializó a los trabajadores de las granjas de la Zona 3 el procedimiento a realizar (***Gráfico 33***), las condiciones para la toma de muestra de heces, manteniendo los principios éticos y morales. De esta manera, el personal de las granjas confirmó su participación con la aprobación de un consentimiento informado que aseguró la privacidad de los datos recopilados. Por otro lado, se aplicó una encuesta (***Anexo*** 3) a los participantes para identificar los factores de riesgo asociados a la colonización de microrganismos multirresistentes en la práctica laboral.

2.8 PRUEBAS ESTADÍSTICAS

Hipótesis: Existe colonización de *Escherichia coli* BLEE y *Salmonella sp.* en trabajadores de granjas avícolas de la Zona 3.

Se validó la hipótesis planteada mediante la prueba del chi cuadrado, para determinar si existe colonización de *Escherichia* coli BLEE y *Salmonella sp.* en los trabajadores de las granjas avícolas vs el grupo control. Además, se calculó la frecuencia relativa porcentual para identificar la frecuencia de genes productores de BLEE y colonización bacteriana. Los instrumentos de recolección de datos fueron mediados por la observación del investigador y su registro en hojas de recolección de datos.

2.9 DESCRIPCIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS

2.9.1 Consentimiento Informado

Se elaboró un documento titulado: “Consentimiento Informado para recolección, uso y almacenamiento de muestras biológicas y datos personales”, (***Anexo 4***) con la

finalidad de garantizar la confidencialidad de la información de los participantes de este proyecto de investigación, cuya participación es netamente voluntaria. Los datos recopilados fueron tratados con confidencial, para ello se les asignó un código alfanumérico. En caso de que los resultados de este estudio sean publicados en revistas médicas o presentados en congresos médicos, su identidad no será revelada.

2.9.2 Codificación de los pacientes

Se realizó una codificación alfanumérica para mantener el anonimato los datos personales registrados, en base a la ubicación de la granja avícola, es decir, Patate (P), Yambo (Y) y Baños (B) y orden establecido, como se explica a continuación.

Ejemplo de codificación:

Localidad-Orden secuencial.

P001, Y027, B067

Nota: En base a esta codificación las muestras fueron identificadas de manera correcta para su procesamiento y análisis en el laboratorio de Microbiología y Biología Molecular.

2.9.3 Protocolo de toma de muestra de heces (*Gráfico 5*)

A todos los pacientes se les socializó el protocolo de toma de muestra (***Gráfico 2***) y se les entregó los recipientes estériles para su recolección. De manera detallada el investigador expuso el siguiente protocolo:

1. Correcto lavado de manos con agua y jabón.
2. Rotular la parte exterior del envase de recolección con la información personal.
3. Antes de recoger la muestra colocar un pedazo de plástico o envoltura sobre la tasa del inodoro, para mayor seguridad ajustar con cinta adhesiva.
4. Realizar la deposición una vez haya bajado la tapa del inodoro, sobre el material colocado previamente.
5. Abrir el envase y con ayuda de la cuchara incorporada en el recipiente colocar pequeñas porciones de la muestra en el interior del envase.
6. Cerrar el recipiente de relección.
7. Colocar en una bolsa plástica el recipiente de recolección.

8. Desechar los materiales utilizados para la recolección y lavarse bien las manos [45].

El investigador rotulo y codificó las muestras de cada paciente de manera adecuada de acuerdo con el apartado “2.8.2 Codificación de los pacientes”.

Criterios de aceptación y rechazo de la muestra

Criterios de aceptación

- Identificación de la muestra.
- Cantidad suficiente para el procesamiento (2-5 gr.).
- Muestra libre de contaminantes externos [45].
- La muestra debe estar contenida en el recipiente entregado por el investigador.

Criterios de rechazo

- Recipientes sin identificación de la muestra.
- Cantidad insuficiente (< 2 gr.).
- Presencia de contaminantes visibles en la muestra.
- Muestra contenida en recipientes no estériles [45].

Gráfico 2. *Guía pata la toma de muestra de heces*



Fuente: Illinois Department of Public Health, 2019 [45].

Elaborado por: Escudero Heredia Steeven Patricio

2.9.4. Protocolo de toma de muestra de hisopado de manos (*Gráfico 5*)

- El investigador realizó la toma de muestra durante la jornada de trabajo, por lo que a todos los pacientes se les pidió que se retirarán los guantes para llevar a cabo el procedimiento.
- Con un hisopo estéril humedecido de en caldo nutritivo, se froto sobre la superficie de la mano en movimientos circulares, entre los dedos y uñas. (***Gráfico 35***)
- Se guardó la muestra en tubos de caldo BHI
- Los tubos de caldo BHI fueron almacenados en un recipiente hermético (cooler)
- El investigador rotulo y codificó las muestras de cada paciente de manera adecuada de acuerdo con el apartado “2.8.2 Codificación de los pacientes”.

2.9.5. Aislamiento bacteriano (*Gráfico 6)*

1. El área de trabajo (cámara de flujo laminar) fue limpiada con toallas de papel absorbente y alcohol al 70%.
2. Se esterilizó el asa microbiológica en anillo, al pasarla por el mechero (al rojo vivo) y dejó enfriar el asa.
3. Previo al cultivo bacteriano se realizó un pre-enriquecimiento de las muestras de heces, las cuáles fueron inoculadas en agua peptonada e incubadas durante 24 horas a 37°C. (***Gráfico 36***)
4. Al día siguiente se realizó el aislamiento bacteriano a partir de las muestras de heces en agua peptonada.
5. Las muestras fueron sembradas mediante la técnica de agotamiento de estrías. (***Gráfico 37***)
6. Por cada estriado se flameó con la finalidad de ir reduciendo la carga bacteriana.
7. Al finalizar el procedimiento se esterilizó el asa [46].
8. Se incubó a 37°C durante 24 horas.
9. Al día siguiente se valoró el crecimiento bacteriano en base a la morfología macroscópica.

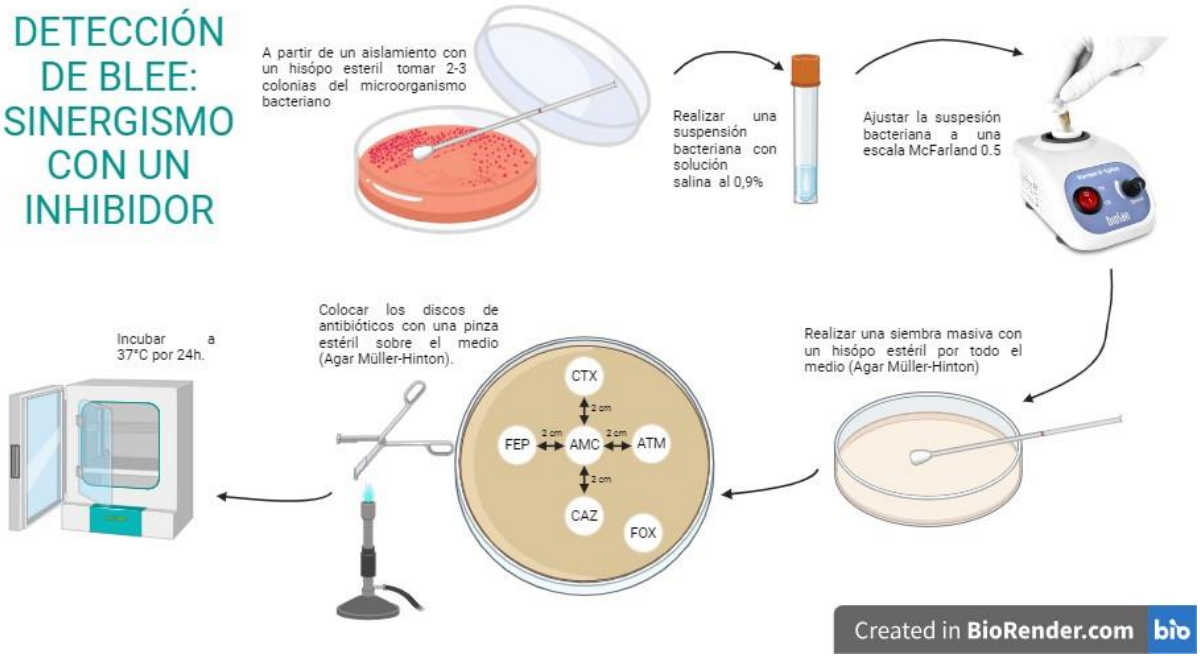
2.9.6 Pruebas Bioquímicas (*Gráfico 6*)

1. El área de trabajo (cámara de flujo laminar) fue limpiada con toallas de papel absorbente y alcohol al 70%.
2. Se esterilizaron las asas microbiológicas pasándolas por el mechero (al rojo vivo) y dejar enfriar el asa.
3. Para la identificación de *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Salmonella sp.*, las colonias bacterianas fueron inoculadas en una serie de baterías bioquímicas: TSI, Citrato, Urea, RM, SIM. (***Gráfico 38***)
4. Finalmente, las baterías bioquímicas fueron incubadas por 24 horas a una temperatura de 37 °C.
5. La interpretación de cada batería bioquímica fue realizada de acuerdo a los requerimientos nutricionales del microorganismo en estudio**.**

2.9.7 Determinación de la Susceptibilidad a los antibióticos

1. A partir de las colonias aisladas se realizó una suspensión bacteriana con solución salina a una escala McFarland al 0.5. (***Gráfico 39***)
2. Se inoculó la suspensión bacteriana en el Agar Müller Hinton mediante una siembra masiva con un hisopo estéril.
3. Se colocaron los discos de antibióticos a una distancia de 2cm con ayuda de una pinza estéril.
4. Se realizaron dos cajas por cada cepa identificada de la siguiente manera:
    - Caja 1: Detección de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE): Colocar discos de una aminopenicilina combinada con un inhibidor de betalactamasas: Amoxicilina más Ácido Clavulánico (AMC) en el centro de la placa y alrededor añadir discos de cefalosporinas de tercera generación: Cefotaxima (CTX), Ceftazidima (CAZ), cefalosporina de cuarta generación: Cefepime (FEP) y un monobactámico: Aztreonam (ATM) y Cefoxitin (FOX). **(*Gráfico 3)***
5. Discos usados en *Escherichia coli*:
    - Gentamicina (CN), Amikacina (AK), Ciprofloxacina (CIP), Imipenem (IPM), Ertapenem (EMP), Meropenem (MEM).
6. Discos usados en *Salmonella sp.:*
    - Azitromicina (AZM), Ciprofloxacina (CIP), Ácido Naldíxico (NA), Ampicilina (AMP), Trimetoprima-sulfametoxazol (SXT), Imipenem (IPM), Meropenem (MEM).
7. Finalmente se incubó a 37°C durante 24 horas y evaluó la susceptibilidad antimicrobiana [31]. (***Gráfico 40***)

Gráfico 3. *Detección de BLEE. Sinergismos con un inhibidor*



Elaborado por: Escudero Heredia Steeven Patricio.

Fuente: Calvo et al., [31]

2.9.8 Extracción de ADN (*Gráfico 4*)

Dilución TE 20X comercial

- Su utilizó una solución TE 20X comercial, a partir de la cual se prepararon 500ml de solución de trabajo para llegar a una concentración final TE1X. Se debe tener en cuenta que se partió de una concentración solución madre TE20X comercial, por lo que se calculó de la siguiente manera:

$$V1 * C1 = V2 * C2$$

$$V1 = \frac{V2 * C2}{C1}$$

$$V1 = \frac{500\ ml * 1X}{20X}$$

$$V1 = 25\ ml$$

- Se tomo 25 ml del volumen calculado de TE 20X comercial y se aforó a 500 ml con agua destilada para llegar a una concentración final de TE1X.

- Se dispensó 400 µL de TE 1X en tubos Eppendorf de 1.5 ml para la suspensión de extracción de ADN

La solución TE 1X fue usada para almacenar el material genético, estabilizar el pH de la solución y permitir la separación de los ácidos nucleicos. Además, para la extracción de ADN se empleó un método químico basado en la variación de temperaturas conocido como shock térmico (***Gráfico 42***), para lo cual se siguió el siguiente procedimiento:

Shock Térmico

- Al iniciar el proceso las muestras fueron llevadas a vortex para una correcta homogenización.
- Se colocó las muestras de manera ordenada en el termobloque programado a una temperatura de 95°C durante 10 minutos.
- Una vez trascurrido el tiempo las muestras fueron sometidas a una temperatura de -20°C durante 20 minutos.
- Nuevamente, se colocaron las muestras en el termobloque ajustado a una temperatura de 95°C durante 10 minutos.
- Finalmente, las muestras se centrifugaron a 14 500 rpm durante 5 minutos [42,43].

2.9.9 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (*Gráfico 4*)

Preparación de las muestras

- Se calculó la Master Mix de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 1. *Preparación de la Master Mix*

Reactivos	Volumen	Concentración final
Agua	10 µL	N.A.
GoTaq	12 µL	1X
Primer Forward	1 µL	0.1–1.0µM
Primer Reverse	1 µL	0.1–1.0µM
ADN	1 µL	**<250ng**
Total	25 µL	

- Se tuvo en consideración las siguientes condiciones de los cebadores empleados para la reacción, las cuales se detallan a continuación:

Tabla 2. *Cebadores empleados en la PCR*

Nombre del gen	Nombre del cebador	Secuencia	Amplicón (pb)	Referencias
bla_{CTX-M}	CTX-M F	ATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGC	593	Dierikx et al. 2010[47]
	CTX-M R	TGGGTGAAGTAAGTGACCAGAATCAGCGG		
bla_{TEM}	TEM F	GAGTATTCAACATTTTCGT	*857*	Maynard et al. 2003 [48]
	TEM R	ACCAATGCTTAATCAGTGA		
bla_{SHV}	SHV F	AGCCGCTTGAGCAAATTAAAC	*713*	Alyamani etl al. 2017[49]
	SHV R	ATCCCGCAGATAAATCACCAC		

Protocolo de PCR

El protocolo llevado a cabo para la amplificación del ADN (***Gráfico 44***) se resume en la siguiente tabla:

Tabla 3*. Temperatura/tiempo de la reacción*

Desnaturalización Inicial	Desnaturalización	Anillamiento	Elongación	Elongación Final
94.0 °C (5 min)	94.0 °C (30 seg)	51.0°C (40seg)	72.0 °C (1 min)	72.0 °C (7 min)

Preparación del buffer TAE 1X y el gel de electroforesis

- Para la preparación del gel y corrida electroforética se preparó 1000 ml de solución de trabajo TAE 1X a partir de la solución madre TAE 40X, de la siguiente manera:

$$V1 * C1 = V2 * C2$$

$$V1 = \frac{V2 * C2}{C1}$$

$$V1 = \frac{1000\ ml * 1X}{40X}$$

$$V1 = 25\ ml$$

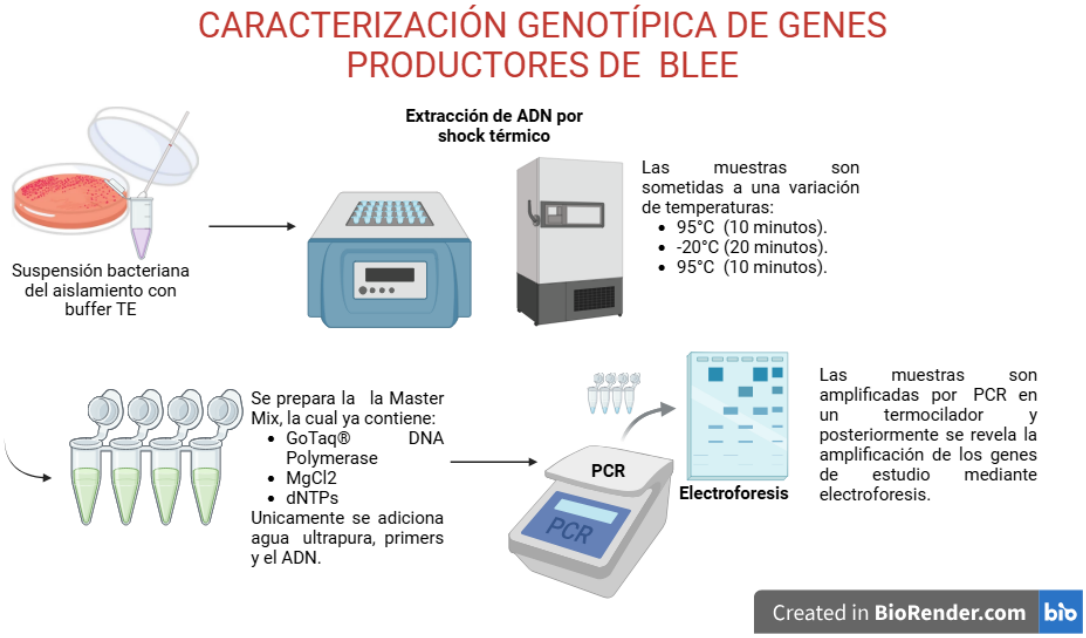
- Se dispensó 25 ml de TAE 40X y aforó a 1000 ml con agua destilada.
- Se prepararon dos geles de agarosa el primero con 0,9 gr. de agarosa de grado molecular en 60ml de solución de trabajo TAE1X y otro de 0,45 gr. de agarosa en 30 ml de dicha solución de trabajo.
- Se homogenizó la preparación y calentó en el microondas hasta obtener una solución transparente.
- Se dejó enfriar la solución aproximadamente hasta 50 °C.
- Se colocó 6 µL de intercalante Syber Safe en el gel grande y 3 µL en el gel pequeño.
- Homogenizar correctamente.
- Se colocó la preparación en el molde correspondiente.
- De acuerdo a la ubicación de los peines el molde fue nivelado para la formación de los pocillos en el gel de electroforesis.
- Se dejó solidificar durante 30 minutos,
- Cuidadosamente, se retiraron los peines y colocó el gel en la cámara de electroforesis.
- Finalmente, el sobrante de la solución TAE 1X se dispensó en la cámara de electroforesis hasta cubrir completamente el gel.

Electroforesis

- Se dispensó un volumen de 3µL por muestra, incluido controles y marcador de peso molecular. En el primer pocillo se colocó el Ladder.
- Se colocó la tapa de la cámara de electroforesis.
- Se conectaron los cables de acuerdo a las cargas correspondientes (polo positivo-polo negativo).

- Previamente fue configurada la fuente de poder a 70V durante 50 minutos. (***Gráfico 45***)
- Al finalizar la corrida electroforética se desconectaron los cables y apagó la fuente de poder.
- Para la identificación de los genes amplificados se colocó el gel en fotodocumentador ChemiDoc Bio-Rad [41]. (***Gráfico 46***)

Gráfico 4. *Caracterización genotípica de genes productores de BLEE*



Elaborador por: Escudero Heredia Steeven Patricio.

Fuente: Vázquez et al., & Lestari et al., [42,43]

2.9.10 Control de calidad

Medios de Cultivos

Para la validación de las pruebas realizadas se aplicó un sistema de control de calidad basado en el uso de cepas de referencia (ATCC) que permitieron la valoración del rendimiento de los medios de cultivo usados.

Tabla 4. *Control de calidad Agar EMB + Ceftriaxona*

Medio de cultivo	Código	Marca	Cepas control	Observaciones	Crecimiento bacteriano
Agar EMB	TM336	TM-MEDIA	*E. coli* ATCC 25922	Control negativo (cepa salvaje)	Inhibición del crecimiento bacteriano
Agar EMB	TM336	TM-MEDIA	*E. coli* 216	Control positivo BLEE (bla_{CTX-M} / bla_{TEM})	Crecimiento óptimo
Agar EMB	TM336	TM-MEDIA	*K. penumoniae* ATCC 700603	Control positivo BLEE (bla_{SHV})	Crecimiento óptimo

Tabla 5. *Control de calidad Agar XLD*

Medio de cultivo	Código	Marca	Cepas control	Observaciones	Crecimiento bacteriano
Agar XLD	TM492	TM-MEDIA	*E. coli* ATCC 25922	Control negativo (cepa salvaje)	Crecimiento óptimo
Agar XLD	TM492	TM-MEDIA	*Salmonella typhymurium ATCC 14028*	Control positivo	Crecimiento óptimo

Susceptibilidad Antimicrobiana

Para la valoración del efecto de los discos de antibióticos, estos fueron colocados sobre una placa de Agar Müller Hinton con la cepa control *E. coli* 25922 (cepa salvaje).

Tabla 6. *Control de calidad de los discos de antibióticos*

Antibiótico	Marca	Halo de inhibición (mm)	Punto de corte QC (CLSI-M100)	Observaciones
Amoxicilina / Ácido clavulánico	OXOID	30	18-24	Óptimo
Cefotaxima	OXOID	31	29-35	Óptimo
Ceftriaxona	OXOID	30	29-35	Óptimo
Ceftazidima	OXOID	31	25-32	Óptimo
Cefoxitina	OXOID	29	23-29	Óptimo
Cefepime	OXOID	32	31-37	Óptimo
Aztreonam	OXOID	32	28-36	Óptimo
Gentamicina	OXOID	21	19-26	Óptimo
Amikacina	OXOID	24	20-26	Óptimo
Ciprofloxacina	OXOID	30	29-38	Óptimo
Imipenem	OXOID	29	26-32	Óptimo
Ertapenem	OXOID	31	29-36	Óptimo
Meropenem	OXOID	32	28-35	Óptimo
Colistina	OXOID	13	11-17	Óptimo

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los aislamientos bacterianos fueron sometidos a un proceso de extracción de ADN por shock térmico (***Gráfico 42***), las muestras fueron medidas mediante espectrofotometría en el equipo Nanodrop (***Gráfico 43***), obteniendo concentraciones entre un rango de 17,8 – 118,0 ng/µL, previo al procedimiento de PCR para evaluar la viabilidad del material genético.

Tabla 7. *Concentraciones de ADN de las muestras de E. coli BLEE*

N°	Muestras	Concentración de ADN
1	P002	78,4 ng/µL
2	P003	79,1 ng/µL
3	P004	84,2 ng/µL
4	P006	90,1 ng/µL
5	P007	110,1 ng/µL
6	P008	108,1 ng/µL
7	P009	103,4 ng/µL
8	P011	118,2 ng/µL
9	P016	112,1 ng/µL
10	P017	108,1 ng/µL
11	P018	108,3 ng/µL
12	P021	114,0 ng/µL
13	Y027	123,4 ng/µL
14	Y029	118,0 ng/µL
15	Y032	105,4 ng/µL
16	Y035	17,8 ng/µL
17	Y036	24,0 ng/µL
18	Y037	52,0 ng/µL
19	Y038	56,7 ng/µL
20	Y040	102, 7 ng/µL
21	Y043	113,1 ng/µL
22	Y045	75,5 ng/µL
23	Y047	88,2 ng/µL
24	Y048	105,8 ng/µL
25	Y050	107,8 ng/µL
26	Y053	79,3 ng/µL
27	Y057	84,5 ng/µL
28	Y061	74,7 ng/µL
29	Y064	87,5 ng/µL
30	B070	83,9 ng/µL
31	B074	58,1 ng/µL
32	B076	49, 5 ng/µL
33	B079	75,5 ng/µL
34	B080	86,9 ng/µL
35	B081	41,1 ng/µL
36	B082	52,8 ng/µL

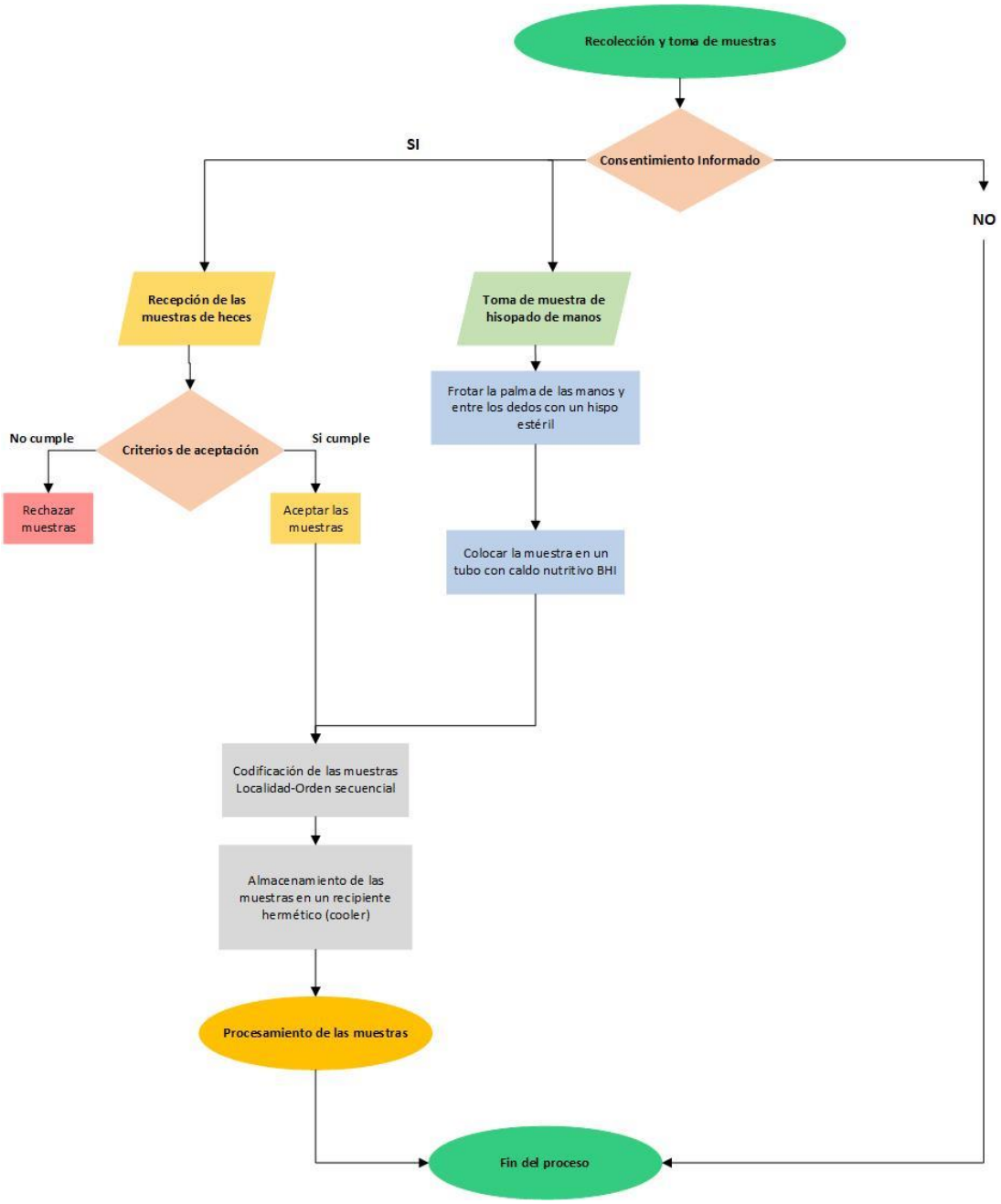
Para la amplificación de los genes productores de BLEE se ocuparon como controles positivos ADN conocido de los genes: bla$_{CTX-M}$, bla$_{SHV}$ y bla$_{TEM}$ y un control negativo de la Master mix con agua de grado molecular. Estos controles estuvieron dispuestos en los primeros pocillos del gel de electroforesis, después del marcador de peso molecular.

Tabla 8. *Controles usados para el estudio molecular*

Genes BLEE	Control positivo	Control negativo
bla_{CTX-M},	*E. coli* 216	*E. coli* 25922
bla_{TEM}	*E. coli* 216	*E. coli* 25922
bla_{SHV}	*K. penumoniae* ATCC 700603	*E. coli* 25922

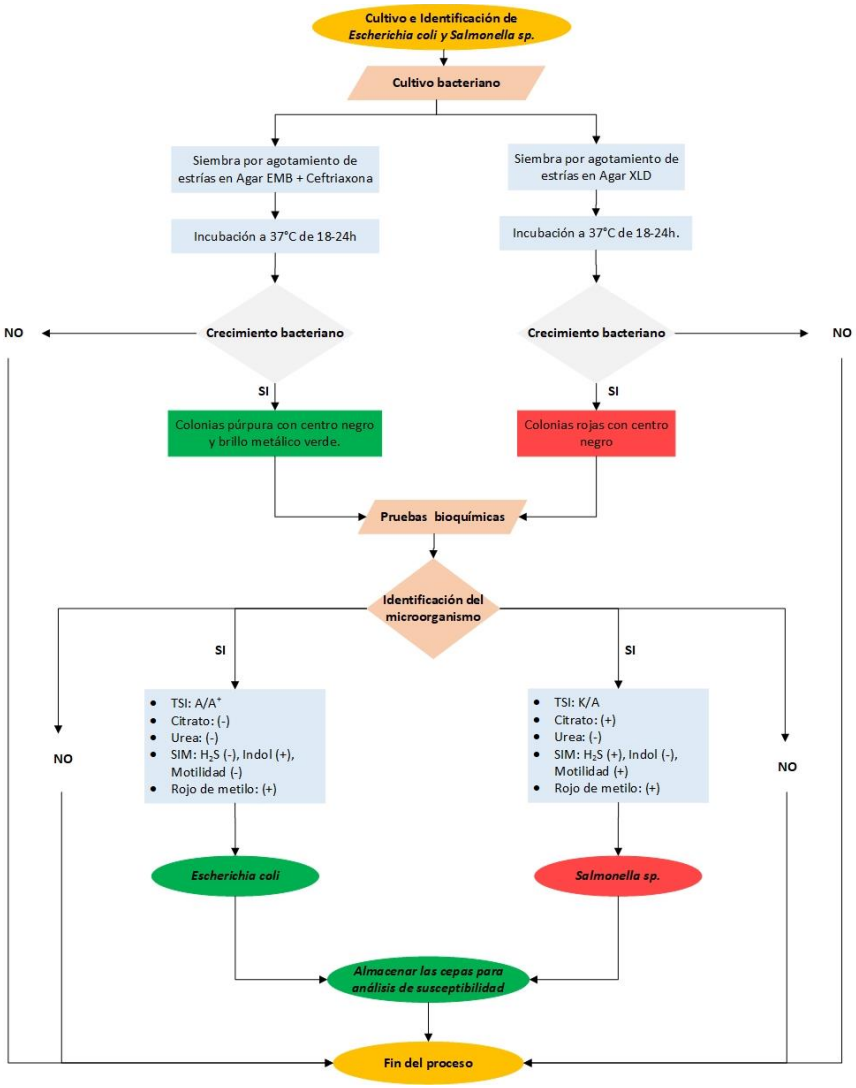
Flujogramas de la toma y procesamiento de las muestras:

Gráfico 5. *Flujograma de recolección y toma de muestra*



Elaborador por: Escudero Heredia Steeven Patricio

Gráfico 6. *Flujograma del cultivo e identificación de Escherichia coli y Salmonella sp.*



Elaborado por: Escudero Heredia Steeven Patricio

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ANÁLISIS E INTERPREATCIÓN DE RESULTADOS

3.1.1 Análisis Microbiológico

Se recolectaron un total de 128 muestras, entre heces e hisopados de manos respectivamente de 64 trabajadores de granjas avícolas de la Zona 3. Estas fueron procesadas en el Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Bacteriológicos UTA-LABB, mediante cultivos microbiológicos para la identificación de *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en agar EMB suplementado con Ceftriaxona (2µg/mL) y para *Salmonella sp.* en agar XLD. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se trabajó con los aislamientos que presentaron crecimiento bacteriano con las siguientes características: colonias moradas con brillo metálico verde en el centro sugestivas de *Escherichia coli* BLEE y colonias rojas con una coloración negruzca en *Salmonella sp.* (***Tabla 9***), además se realizaron pruebas bioquímicas para su confirmación (***Tabla 10***).

Tabla 9. *Morfología macroscópica de los microorganismos en estudio*

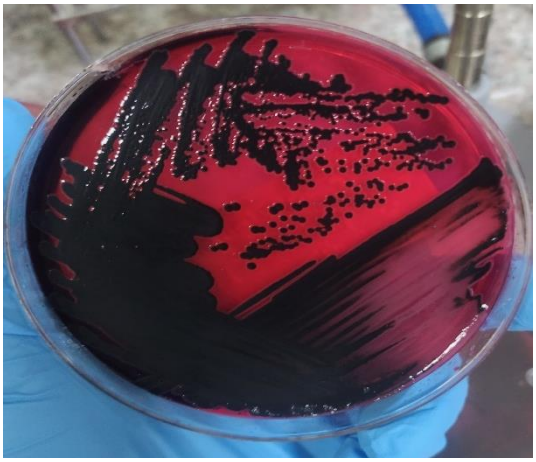
***Escherichia coli* BLEE**	***Salmonella typhymurium ATCC 14028***
	

Tabla 10. *Resultados de las pruebas bioquímicas de los microorganismos en estudio*

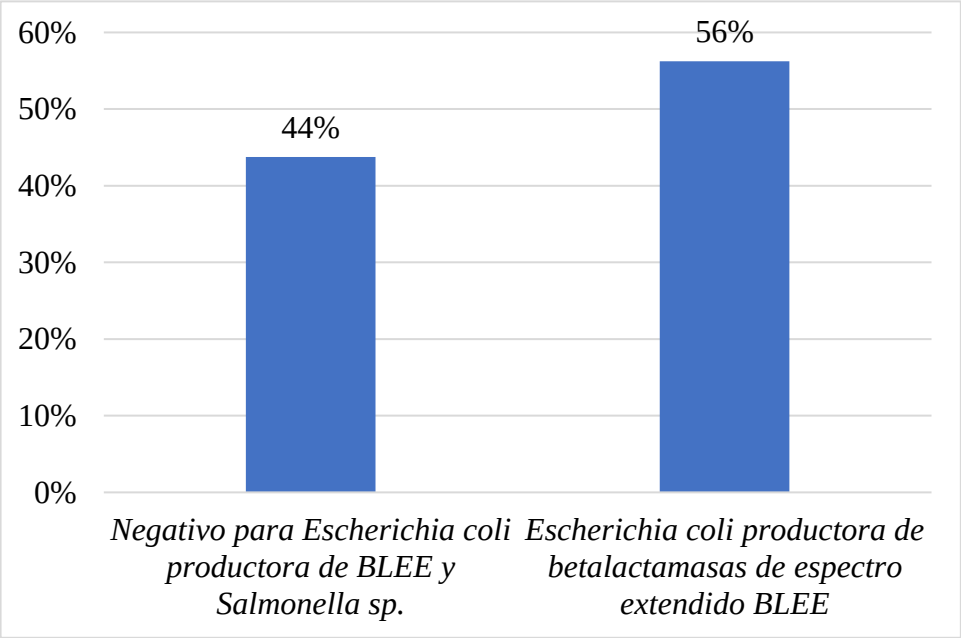
	TSI	**Gas**	**Citrato**	**Urea**	**Motilidad**	**Indol**	**Rojo de metilo**	**H_2S**
Escherichia coli	A/A	+	-	-	+	+	+	-
Salmonella sp.	K/A	+	+	-	+	-	+	+

Elaborado por: Escudero Heredia Steeven Patricio

Análisis e interpretación:

Los resultados de las pruebas bioquímicas confirmaron la presencia de *E. coli* para los 36 aislados de muestras de heces en agar EMB + CRO. Por otro lado, no se registró ningún aislamiento positivo para *Salmonella sp.* en agar XLD.

Gráfico 7. *Microorganismos identificados*



Elaborado por: Escudero Heredia Steeven Patricio

Análisis e interpretación:

A partir de los 36 (56%) aislamientos de *E. coli* se realizaron antibiogramas y pruebas de sinergismos para asegurar la presencia de betalactamasas de espectro extendido

(BLEE) (***Grafico 8***). Además, fueron caracterizados genotípicamente para identificar los principales genes productores de BLEE: bla*CTX-M*, bla*SHV* y bla*TEM* (***Grafico 15***).

Gráfico 8*. Sinergismo positivo para BLEE*

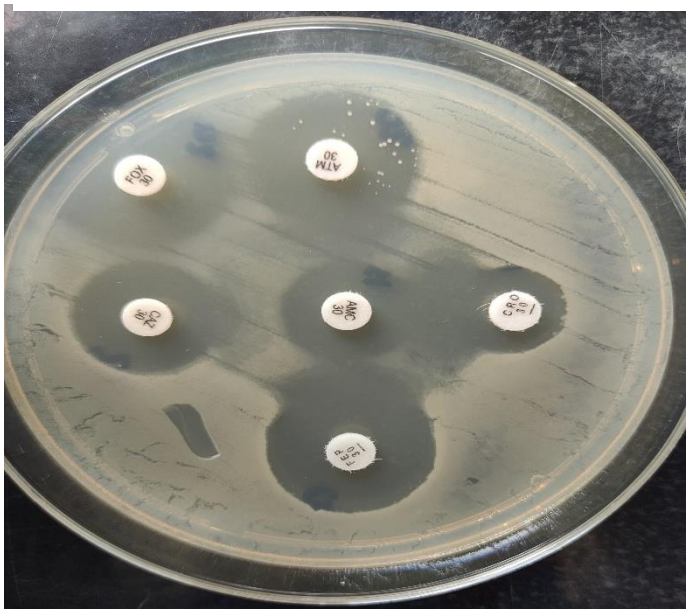
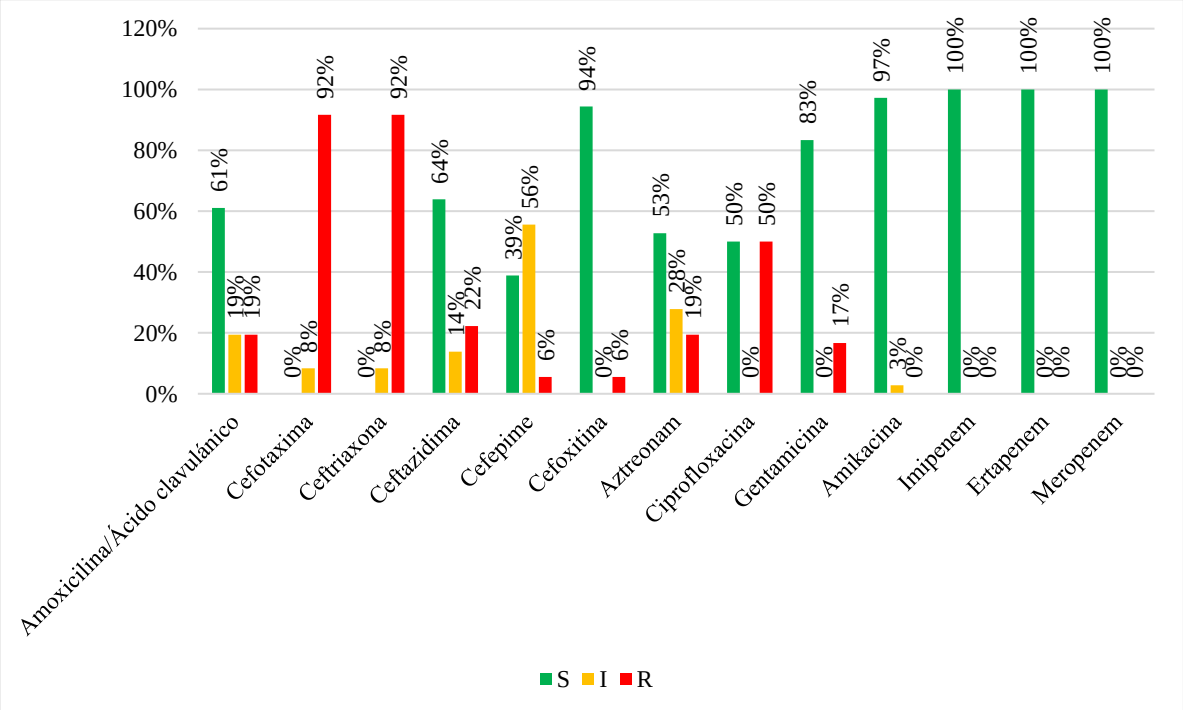


Gráfico 9. *Gráfico 8. Perfil de susceptibilidad de Escherichia coli BLEE*

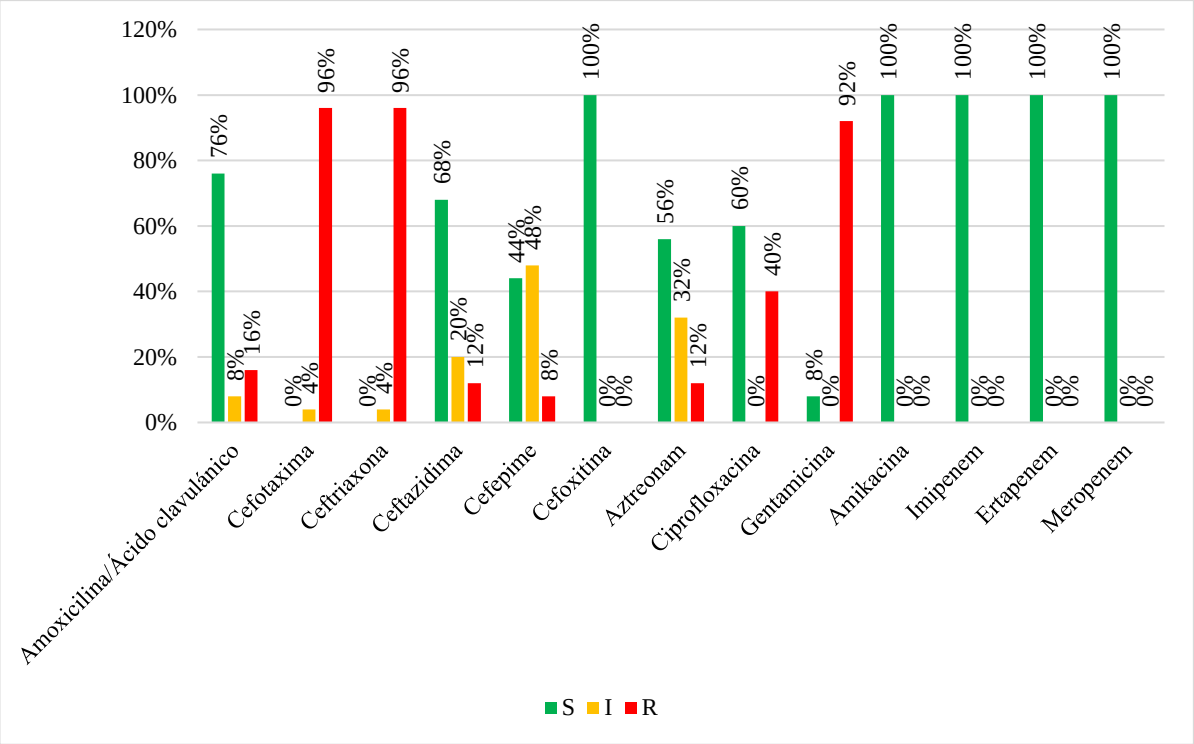


Elaborado por: Escudero Heredia Steeven Patricio

Análisis e interpretación:

Los 36 aislamientos de *Escherichia coli* presentaron sinergismo entre Amoxicilina más ácido clavulánico, (una combinación de una aminopenicilina más un inhibidor betalactámico) con cefalosporinas de tercera y cuarta generación (***Gráfico 9***). Estos registran un perfil de resistencia a las cefalosporinas de tercera generación con un 92% para ceftriaxona y cefotaxima, pero un 22% para ceftazidima. En cuanto a cefepime una cefalosporina de cuarta generación muestra un grado de sensibilidad dosis dependiente del 56%, asimismo para cefoxitina, usado como un indicador de diferenciación de mecanismos de resistencia, presenta una sensibilidad marcada del 94%, Amoxicilina más ácido clavulánico es susceptible en un 61% de las cepas, al igual que un 53% para aztreonam. Por otro lado, muestran resistencia para ciprofloxacina (50%) y en menor proporción para gentamicina (17%). Finalmente, para los demás antibióticos se indica una sensibilidad del 100%, incluyendo a los carbapenémicos.

Gráfico 10. *Perfil de susceptibilidad de Escherichia coli BLEE bla$_{CTX-M}$*

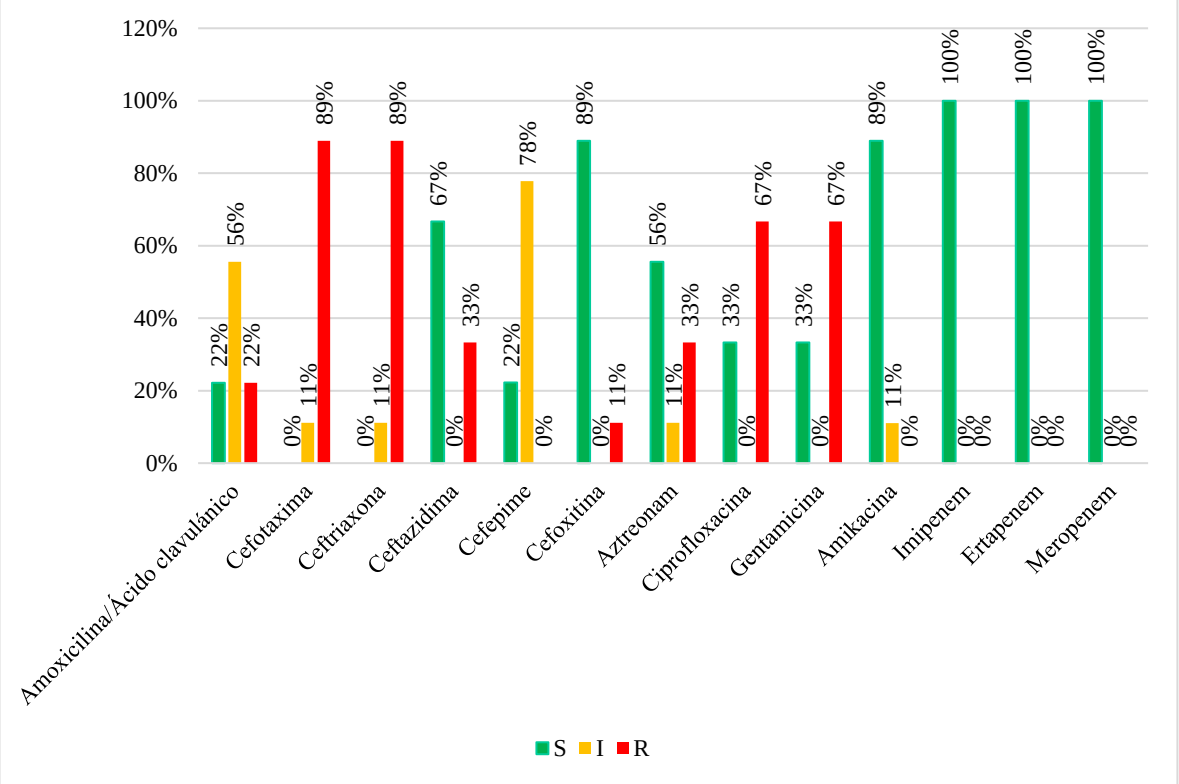


Elaborado por: Escudero Heredia Steeven Patricio

Análisis e interpretación:

De los 36 aislamientos de *Escherichia coli* BLEE, 25 presentaron el gen bla$_{CTX\text{-}M}$. En este caso se evidenció un nivel de resistencia predominante del 96% para ceftriaxona y cefotaxima, cefalosporinas de tercera generación, sin embargo, cefotaxima al ser del mismo grupo de antibióticos expresa un nivel de susceptibilidad para las cepas testeadas en un 68%. Por otro lado, para cefalosporinas de cuarta generación como cefepime muestran un perfil de sensibilidad dosis dependiente del 48%. Como parte de la identificación de BLEE por pruebas de sinergismo, cefoxitin es usado como un indicador, el cuál presentó un 100% de sensibilidad. Amoxicilina más ácido clavulánico y aztreonam son sensibles en un 76% y 56% respectivamente. Por otro lado, entre aminoglucósidos gentamicina muestra un nivel de resistencia elevado del 92%. Ciprofloxacina presenta resistencia de menos de la mitad (40%) de cepas en estudio y el resto de antibióticos son sensibles en un 100% incluso carbapenémicos.

Gráfico 11. *Perfil de susceptibilidad de Escherichia coli BLEE bla$_{CTX\text{-}M}$ y bla$_{TEM}$*



Elaborado por: Escudero Heredia Steeven Patricio

Análisis e interpretación:

De los 36 aislamientos de *Escherichia coli* BLEE, 9 presentaron un genotipo combinado: bla*CTX-M* y bla*TEM* con un perfil de resistencia del 89% a cefalosporinas de tercera generación como cefotaxima y ceftriaxona, sin embargo, presentaron el 67% de sensibilidad para ceftazidima. En cuanto a cefepime una cefalosporina de cuarta generación expresa un grado de sensibilidad dosis dependiente del 78%, al igual que cefoxitin usado como indicador de mecanismos de resistencia es sensible en un 89%. Amoxicilina más ácido clavulánico expresa un nivel intermedio de susceptibilidad (56%), mientras que aztreonam presenta sensibilidad del 56%. Por otro lado, el 67% de las cepas en estudio presentaron resistencia a ciprofloxacina y gentamicina cada una, pero con un elevado porcentaje de sensibilidad para amikacina (89%). Finalmente, el 100% de las cepas son susceptibles para el resto de antibióticos, incluidos el grupo de los carbapenémicos.

Tabla 11. *Perfil de susceptibilidad de cepas BLEE + AmpC*

Microorganismo	**P048** ***E. coli***		**B074** ***E. coli***	
Antibióticos	**Halo de inhibición (mm)**	**Interpretación**	**Halo de inhibición (mm)**	**Interpretación**
Amoxicilina/Ácido clavulánico	12	Resistente	6	Resistente
Ceftriaxona	21	Intermedio	10	Resistente
Ceftazidima	17	Resistente	10	Resistente
Cefepime	29	Sensible	19	Sensible dosis dependiente
*Cefoxitina	14	Resistente	14	Resistente
Aztreonam	25	Sensible	14	Resistente
Ciprofloxacina	12	Resistente	6	Resistente
Gentamicina	6	Resistente	19	Sensible
Amikacina	22	Sensible	22	Sensible
Imipenem	30	Sensible	27	Sensible
Ertapenem	30	Sensible	29	Sensible
Meropenem	31	Sensible	32	Sensible
Genes BLEE	bla*CTX-M*		bla$_{\text{CTX-M}}$, *TEM*	
Mecanismo de resistencia	BLEE + AmpC		BLEE + AmpC	

Nota *: No se reporta, es un indicador de diferenciación de mecanismos de resistencia.

Elaborado por: Escudero Heredia Steeven Patricio

Análisis e interpretación:

Se evidencia que de los 36 aislamientos bacterianos que presentaron sinergia positiva para BLEE, 2 cepas (***Tabla 11***) también son resistentes a cefoxitina, por consecuente, se trata de un otro mecanismo de resistencia a los antibióticos conocido como betalactamasas tipo AmpC. No obstante, pese a que presentan el mismo mecanismo de resistencia su genotipo es diferente, por tal razón, difieren sus perfiles de susceptibilidad. La cepa B074 es resistente a ceftriaxona, mientras que PO74 tiene un nivel intermedio de susceptibilidad para la misma, sin embargo, ambas son resistentes para ceftazidima, otra cefalosporina de tercera generación. En cuanto a cefepime son susceptibles con la particularidad de que B074 expresa un grado de sensibilidad dosis dependiente. Por otro lado, son resistentes para amoxicilina más ácido clavulánico y tan solo B074 no es susceptible para aztreonam. Es evidente un perfil de resistencia para fluoroquinolonas (ciprofloxacina) y aminoglucósidos como gentamicina en el caso de la cepa P048. En cuanto al resto de antibióticos ambas cepas son susceptibles incluso ante el grupo de los carbapenémicos.

3.1.2 Análisis Molecular

Una vez evaluada la concentración del ADN, las muestras fueron amplificadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR) para identificar la presencia de los principales genes productores de BLEE: bla$_{CTX-M}$, bla$_{TEM}$ y bla$_{SHV}$. Los amplicones de la PCR fueron sometidos a un proceso de revelado mediante electroforesis. Para cada gen se valoraron las bandas amplificadas de acuerdo al peso molecular de los controles positivos y su relación, las cuáles se detallan a continuación en las Tablas por cada gen analizado:

Gráfico 12. *Electroforesis del gen bla$_{CTX-M}$*

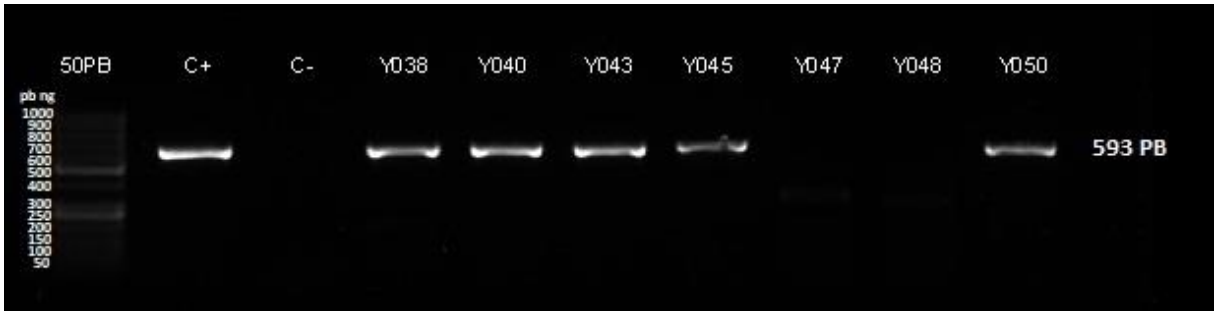


Gráfico 13. *Electroforesis del gen* bla_{TEM}

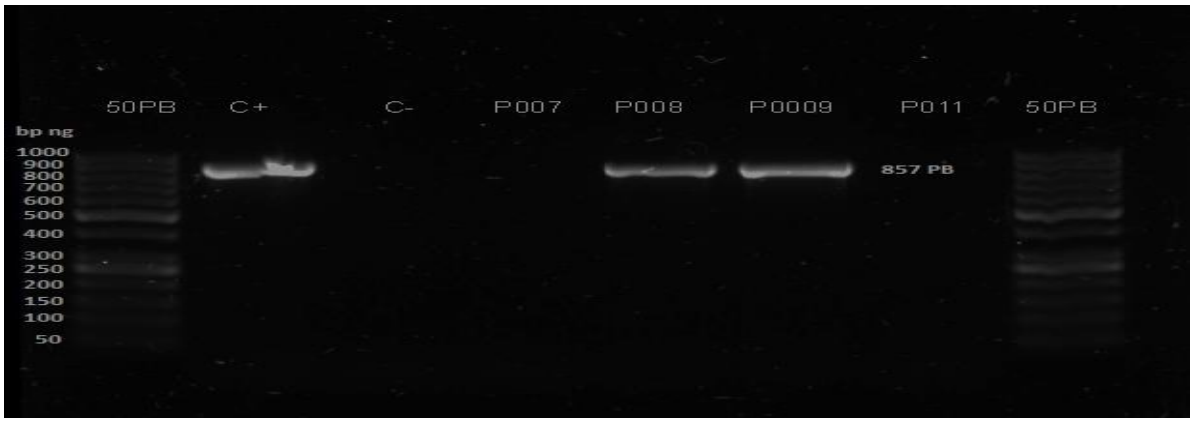
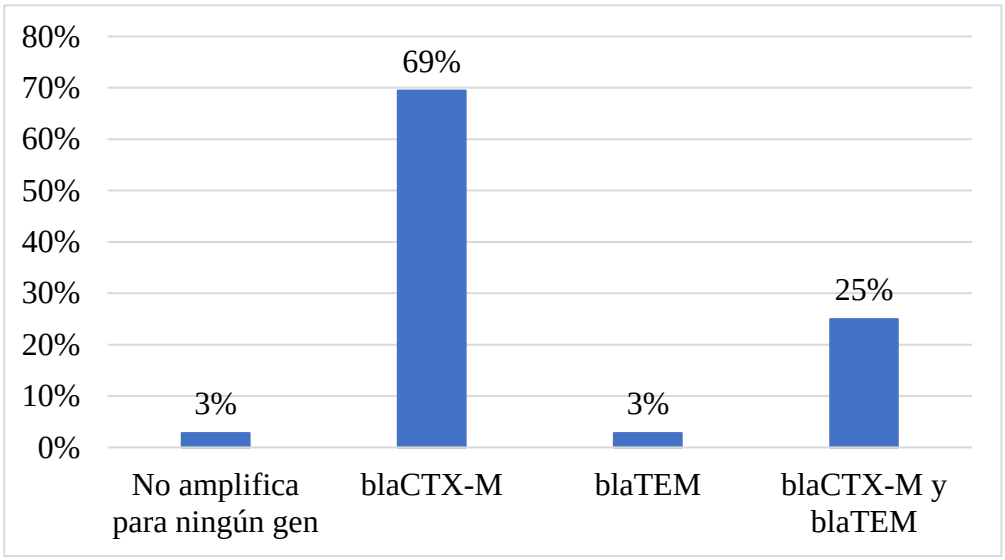


Gráfico 14. *Electroforesis del gen* bla_{SHV}



Gráfico 15. *Reporte de genes productores de BLEE*



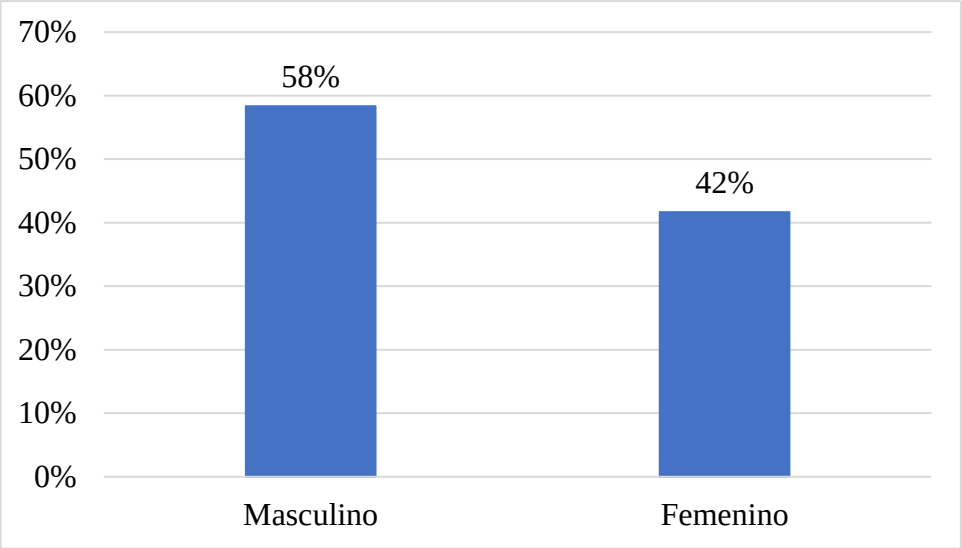
Elaborador por: Escudero Heredia Steeven Patricio

Análisis en interpretación:

De los 36 aislamientos de *Escherichia coli* BLEE, el 69% presenta el gen bla$_{CTX\text{-}M,}$ el 3% el gen bla$_{TEM}$ y ningún microorganismo presentó el gen bla$_{SHV}$. Además, se registraron aislamientos bacterianos con presencia de más de un gen en su composición genética, siendo el 25% correspondiente a la combinación de genes bla$_{CTX\text{-}M}$ y bla$_{TEM}$. Sin embargo, el 3% no registró amplificación para ninguno de los tres genes en estudio.

3.1.3 Análisis de los datos demográficos de la población colonizada

Gráfico 16. *Género*

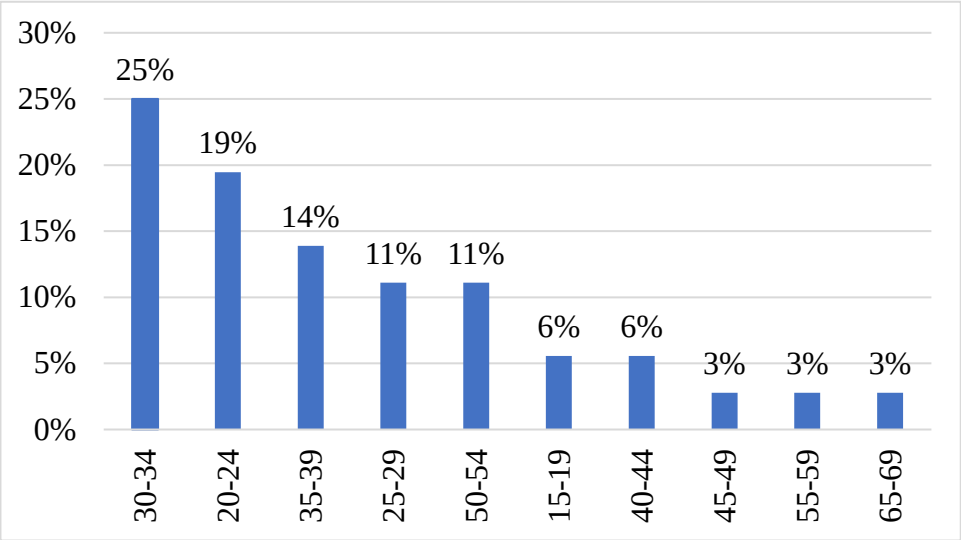


Elaborador por: Escudero Heredia Steeven Patricio

Análisis e interpretación:

De los 36 pacientes que registraron colonización por *Escherichia coli* productora de BLEE, el 58% corresponde al género masculino y el 42% al género femenino.

Gráfico 17. *Edad*

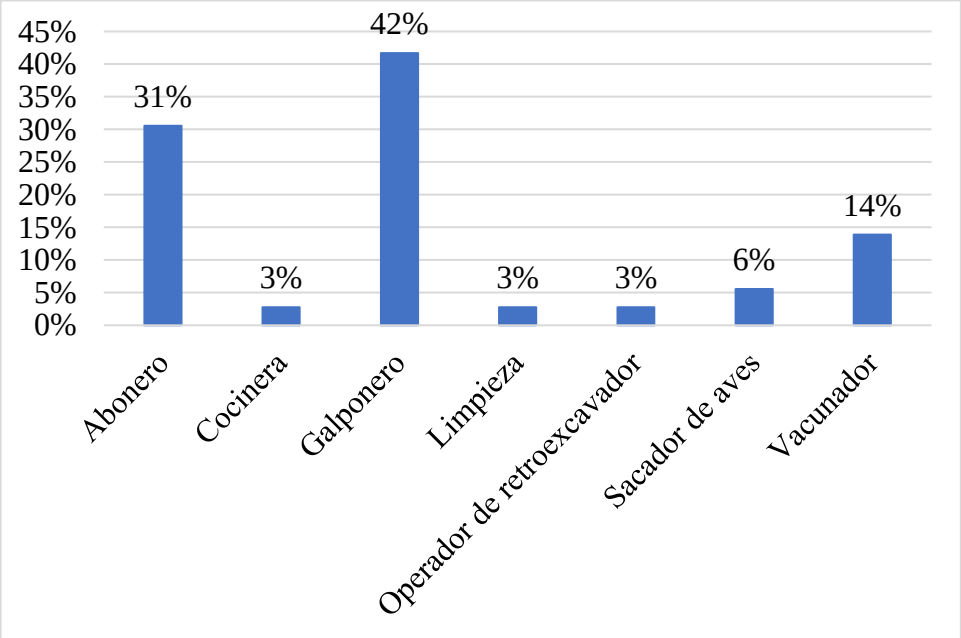


Elaborador por: Escudero Heredia Steeven Patricio

Análisis e interpretación:

Para el análisis de la edad de los 36 pacientes colonizados por *E. coli* BLEE se establecieron rangos, de los cuáles el rango de mayor predominio con un 25% es el de 30-34 años de edad, seguido de el de 20-24 (19%) y 14% de 35-39%. Por otro lado, en menor proporción los rangos que van desde 25-29 y 65-69 años únicamente representan porcentajes de 11%, 6% y 3% respectivamente.

Gráfico 18. *Área de trabajo*



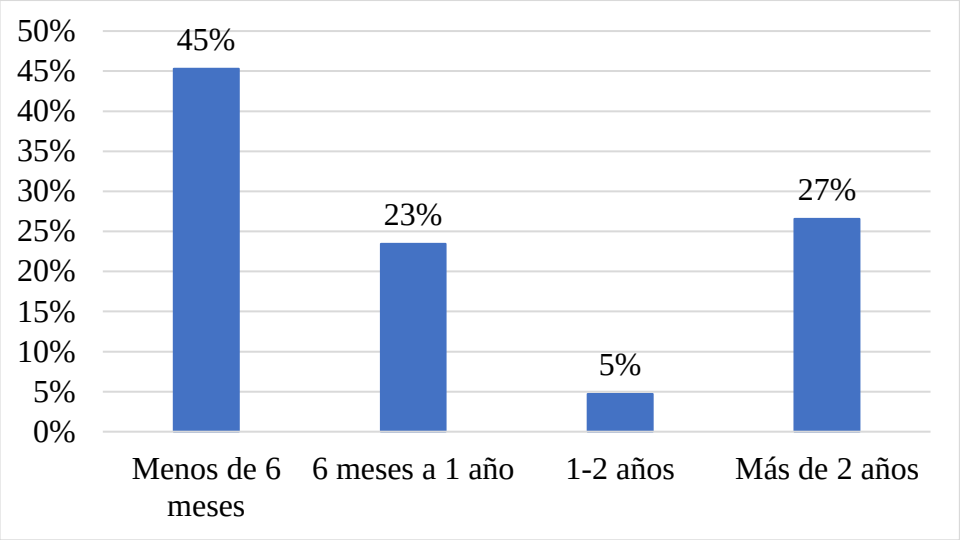
Elaborador por: Escudero Heredia Steeven Patricio

Análisis e interpretación:

De los 36 pacientes, el área de trabajo que presenta mayor frecuencia de pacientes colonizados por *Escherichia coli* BLEE es en un 42% los galponeros y 31% aboneros, seguido del 14% de vacunadores, 6% de sacadores de aves, y el 3% respectivamente del personal de limpieza, cocina y operadores de maquinaria cada uno.

3.1.4 Análisis de la encuesta

Gráfico 19. *Pregunta 1. ¿Cuánto tiempo lleva trabajando en esta unidad?*



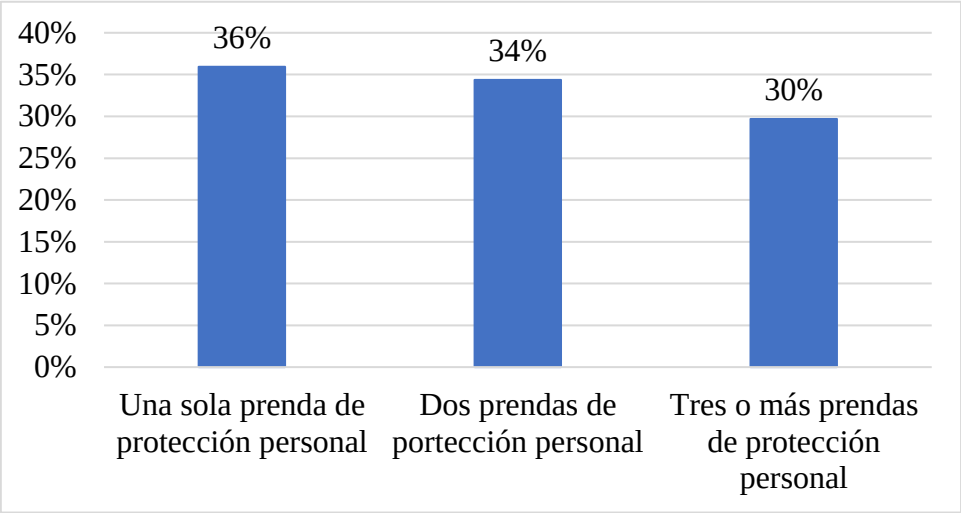
Elaborado por: Escudero Heredia Steeven Patricio

Análisis e interpretación:

De los 64 pacientes encuestados, el tiempo en el que llevan trabajando en la unidad avícola predomínate es de menos de 6 meses con un 45%, seguido del 27% que comprende más de 2 años, el 23% de 6 meses a 1 año y el 5% de 1-2 años.

Además, como parte de la encuesta realizada se evidenció que el 100% de los participantes si se realizan el lavado de manos después de manipular animales, productos o fluidos animales.

Gráfico 20. *Pregunta 3. ¿Qué tipo de protección personal usa?*

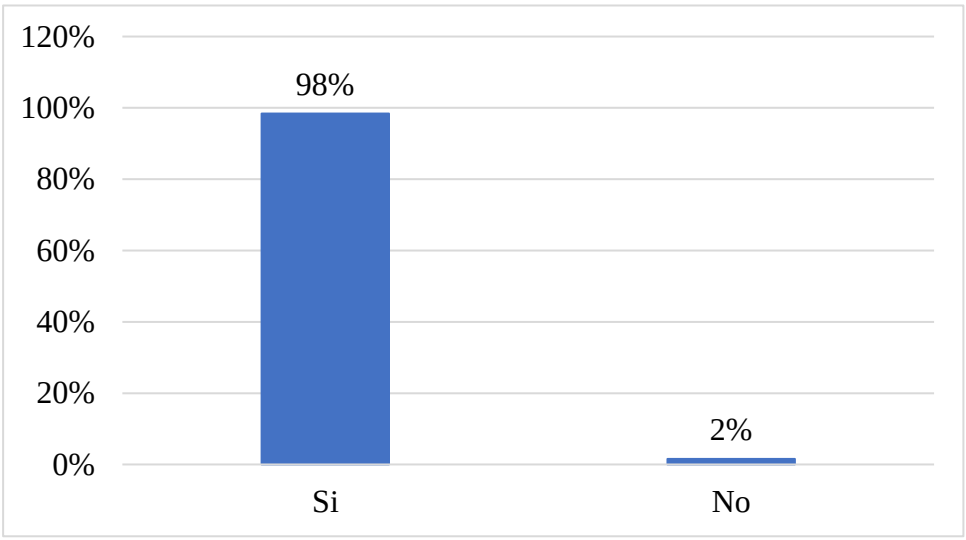


Elaborador por: Escudero Heredia Steeven Patricio

Análisis e interpretación:

Para evaluar el uso de las prendas de protección personal en el personal de las granjas avícolas se agruparon de acuerdo al número de prendas que ocupan a diario. En este aspecto, de los 67 encuestados, el 36% usan una única prenda con mayor predominio del uniforme. En caso de llevar por lo menos dos prendas de protección personal, se registró un mayor uso de la combinación de uniforme y botas. Mientras el 30% afirma usar combinaciones de tres o más prendas, como guantes, uniforme y botas siendo la que mayor grado de ocurrencia tiene.

Gráfico 21. *Pregunta 4. Si usa uniforme para sus actividades, ¿se lo retira antes de ir a casa?*

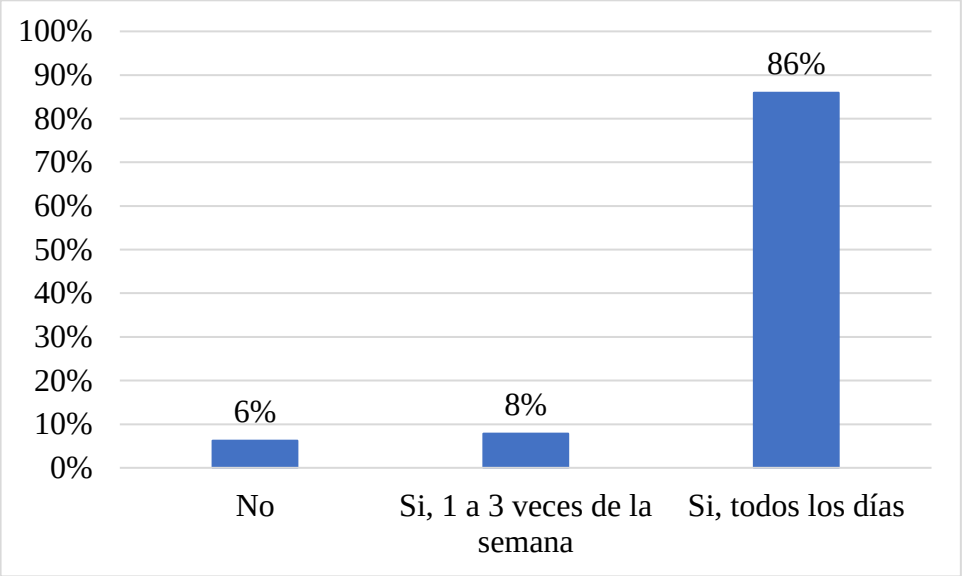


Elaborador por: Escudero Heredia Steeven Patricio

Análisis e interpretación:

De los 64 pacientes, el 98% indicaron que en caso de usar uniforme para sus actividades laborales se lo retiran antes de ir a su casa y únicamente el 2% no lo hace.

Gráfico 22. *Pregunta 5. ¿Tiene contacto directo con los animales?*

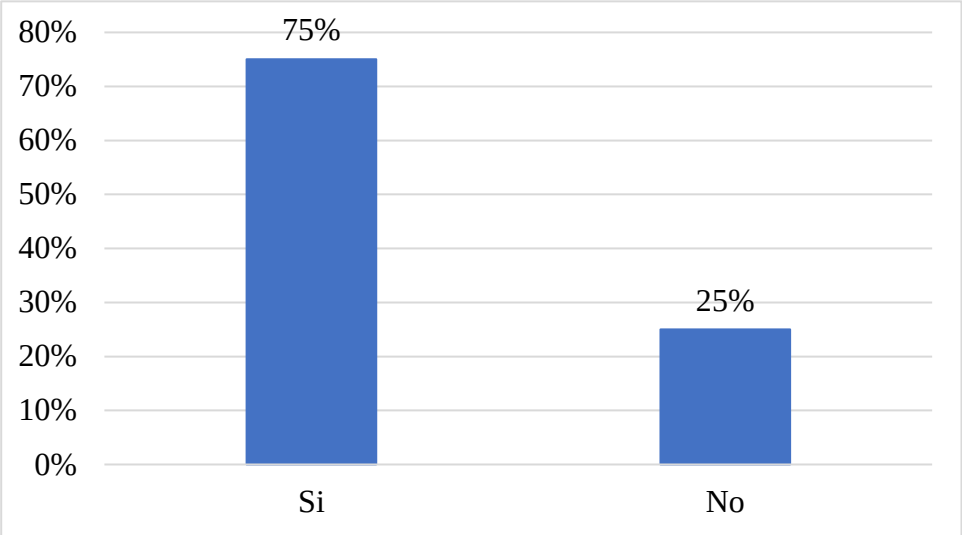


Elaborador por: Escudero Heredia Steeven Patricio

Análisis e interpretación:

De los 64 trabajadores avícolas, el 86% mantienen contacto directo con animales todos los días, mientras que un 8% es de 1 a 3 veces por semana a diferencia del 6% que no tiene contacto con animales.

Gráfico 23. *Pregunta 6. ¿Ha tenido contacto directo con algún fluido animal? (sangre, heces, orina)*

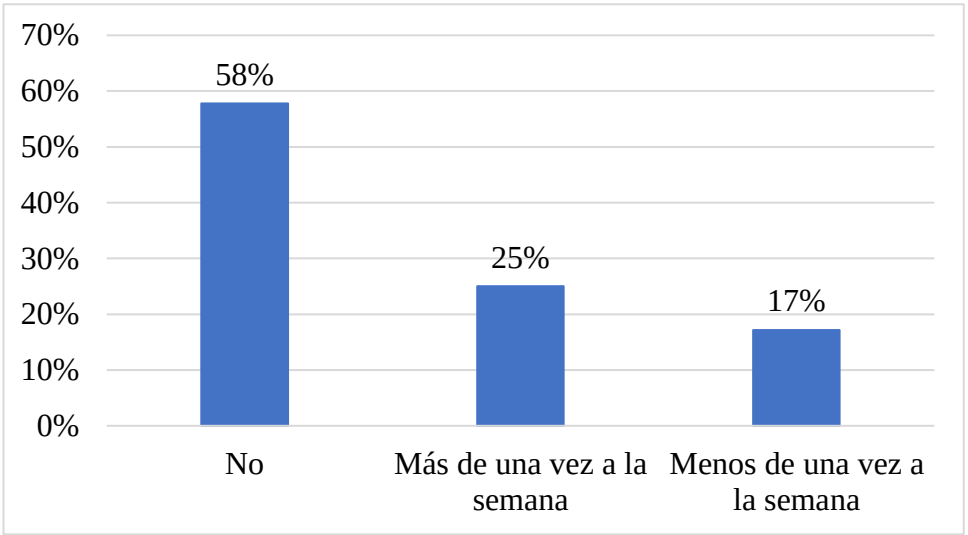


Elaborador por: Escudero Heredia Steeven Patricio

Análisis e interpretación:

De acuerdo a los 64 trabajadores encuestados, el 75% indicaron que han tenido contacto directo con algún fluido animal como: sangre, heces u orina. Por el contrario, el 25% no ha tenido contacto con ningún tipo de fluido animal.

Gráfico 24. *Pregunta 7. ¿Consume usted y/o su familia los productos que se generan en la unidad?*

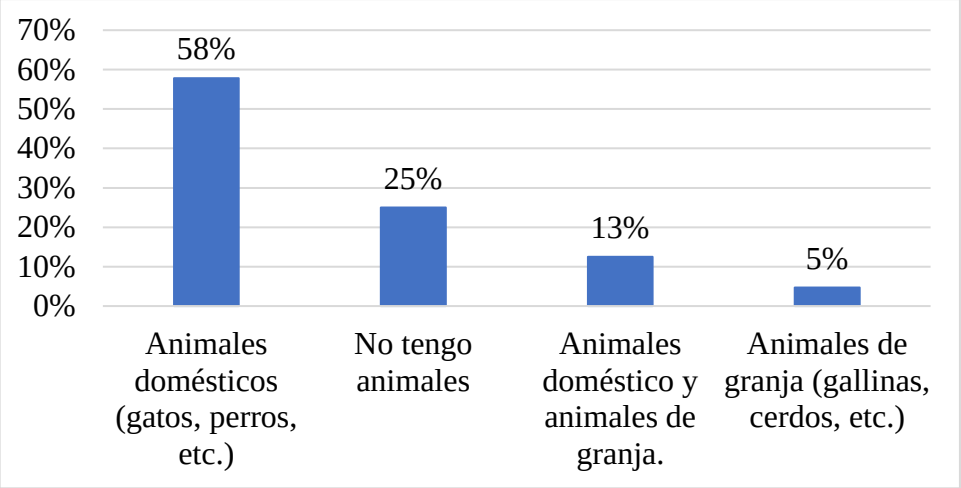


Elaborador por: Escudero Heredia Steeven Patricio

Análisis e interpretación:

De los 64 encuestados, el 58% asegura que ellos y/o su familia no consumen los productos que se generan en su unidad avícola, el 25% indica que si consumen dichos productos más de una vez a la semana y 17% menos de una vez a la semana.

Gráfico 25. *Pregunta 8. ¿Qué tipo de animales tiene en su casa?*

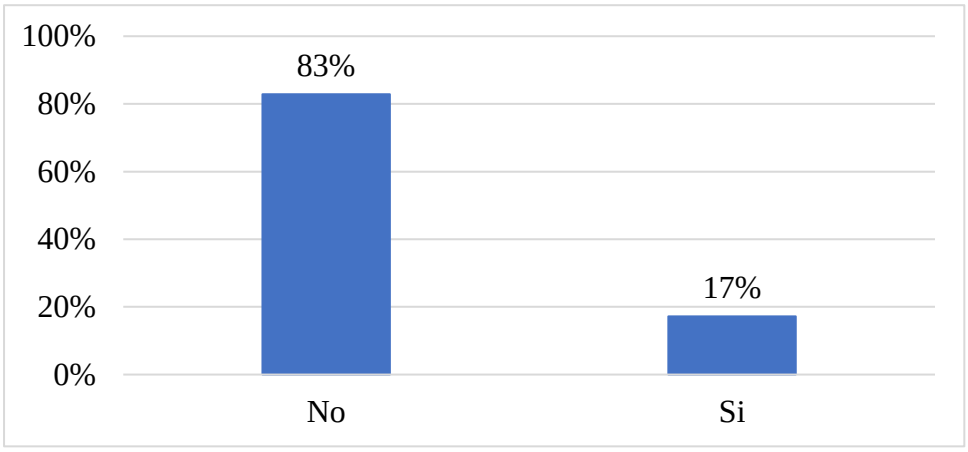


Elaborador por: Escudero Heredia Steeven Patricio

Análisis e interpretación:

De los 64 trabajadores de las avícolas, el 58% posee animales domésticos (gatos, perros, etc.) en su domicilio, el 5% tienen animales de granja (gallinas, cerdos, etc.), el 13% ambos tipos de animales, mientras que el 25% no poseen animales en su casa.

Gráfico 26. *Pregunta 9. ¿En el último año se le ha diagnosticado alguna infección gastrointestinal?*

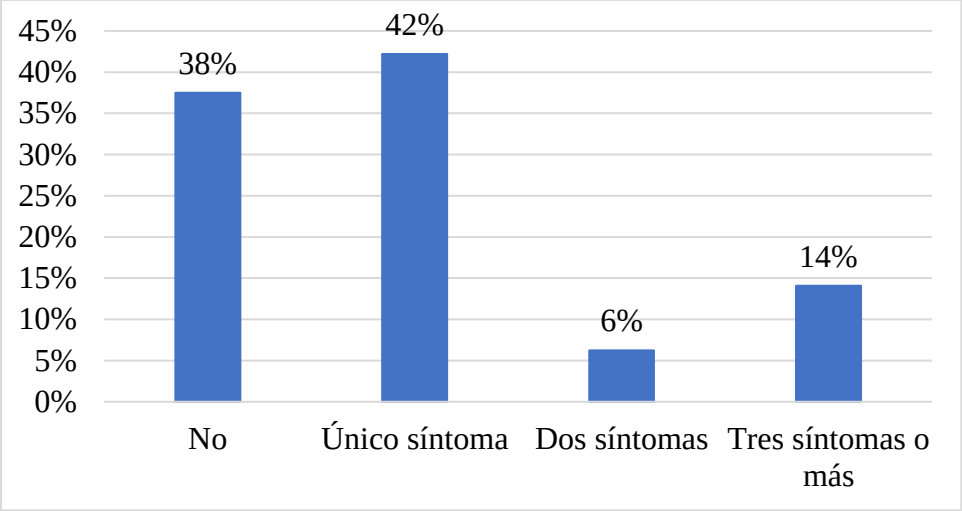


Elaborador por: Escudero Heredia Steeven Patricio

Análisis e interpretación:

Del total de encuestados (n=64), durante el último año el 83% no ha sido diagnosticado con ninguna infección gastrointestinal, a diferencia del 17% que indica si haber padecido algún tipo de infección de este tipo.

Gráfico 27. *Pregunta 10. ¿Ha presentado alguno de los siguientes síntomas relacionados con una afección gastrointestinal en el último mes?*

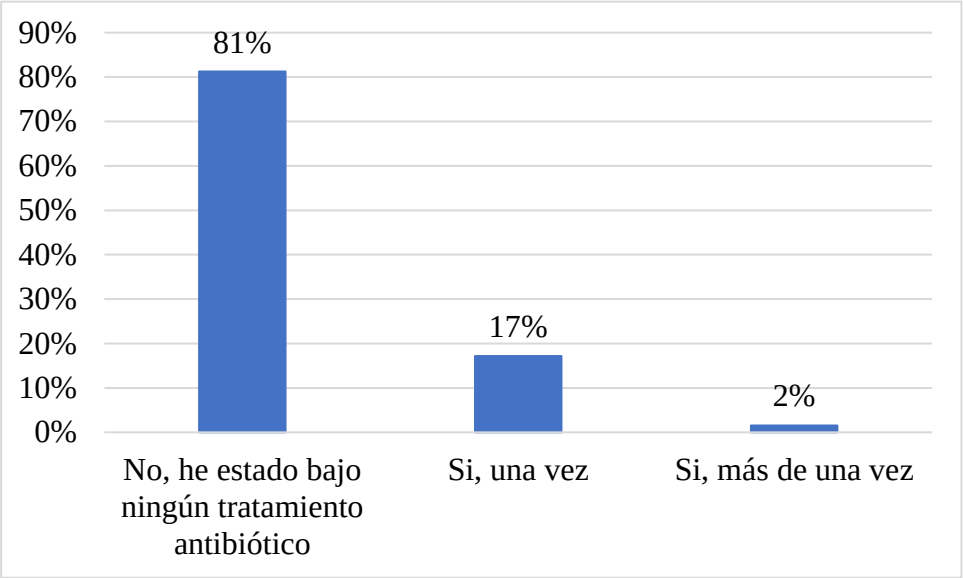


Elaborado por: Escudero Heredia Steeven Patricio

Análisis e interpretación:

Para analizar los síntomas presentados por la población de estudio, se agruparon de acuerdo el grado de ocurrencia, es decir, de los 64 pacientes, durante el último mes el 42% presentó un único síntoma, siendo el dolor abdominal el más frecuente. Por otro lado, algunos participantes indicaron haber tenido en un 6% al menos don síntomas siendo recurrentes la diarrea y la fiebre. Además, se presentó en un 14% de tres síntomas o más en los cuáles la diarrea, el dolor abdominal y la fiebre predominaron en dichas combinaciones. Por otro lado, el 38% de los encuestados no ha registrado ningún síntoma racionado con una afección gastrointestinal.

Gráfico 28. *Pregunta 11. ¿En los últimos 6 meses, ¿ha estado usted bajo algún tratamiento antibiótico?*

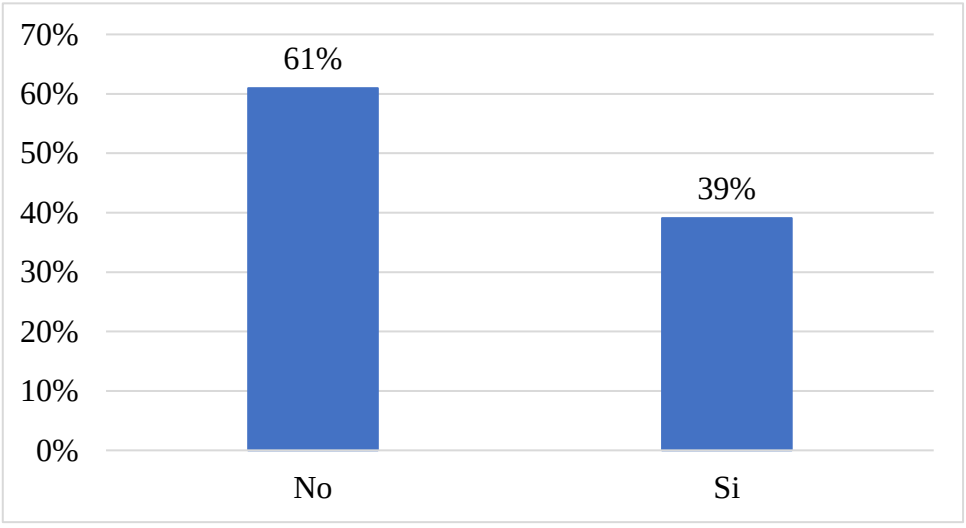


Elaborador por: Escudero Heredia Steeven Patricio

Análisis e interpretación:

De los 64 participantes encuestados, el 81% no ha estado bajo ningún tratamiento antibiótico, el 17% registra haber estado bajo algún tipo de tratamiento una única vez, mientras que el 2% ha estado sujeto a una terapia antibiótica más de una vez.

Gráfico 29. *Pregunta 12. ¿Sabe usted que el uso prolongado de antibióticos puede inducir el desarrollo de resistencia bacteriana a los antibióticos?*

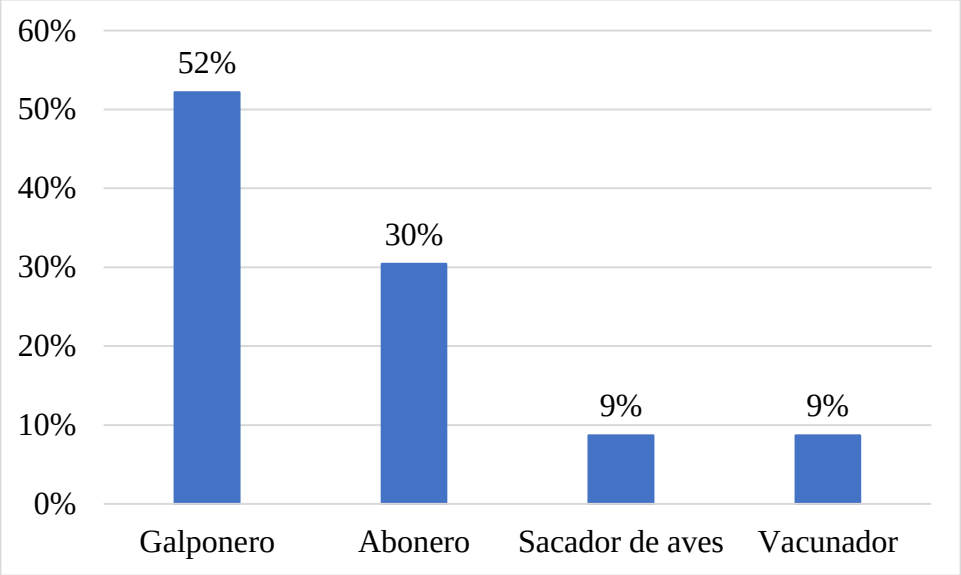


Elaborador por: Escudero Heredia Steeven Patricio

Análisis e interpretación:

En cuanto al conocimiento sobre el uso prolongado de antibióticos, del total de encuestados (n=64), el 61% no tiene conocimiento sobre el desarrollo de resistencia bacteriana a los antibióticos a diferencia del 39% que si tienen conocimiento acerca del tema.

Gráfico 30. *Relación entre el área de trabajo y conocimiento de las consecuencias del uso prolongado de antibióticos*



Elaborador por: Escudero Heredia Steeven Patricio

Análisis e interpretación:

De los 64 encuestados, tomando en cuenta el personal que mantiene contacto directo con las aves de corral se evidenció que el área de trabajo con mayor conocimiento acerca de las consecuencias del uso prolongado de antibióticos en un 52% corresponde a los galponeros y 30% a aboneros y el 9% para sacadores de aves y vacunadores respectivamente.

3.2 ASOCIACION DE FACTORES DE RIESGO CON TRABAJADORES COLONIZADOS CON *E. coli* BLEE

La asociación entre los factores de riesgo y la colonización de *E. coli* BLEE en trabajadores de granjas avícolas de la Zona 3 se analizó mediante la prueba de Chi-cuadrado, identificando una relación estadísticamente significativa (p=0.036) entre la

presencia de *E. coli* BLEE y la respuesta afirmativa a la pregunta 9: "¿En el último año se le ha diagnosticado alguna infección gastrointestinal?". En contraste, para los demás factores de riesgo evaluados, no se encontró ninguna relación estadísticamente significativa ($p \geq 0.05$).

Tabla 12. *Tabla cruzada de la Pregunta 9. ¿En el último año se le ha diagnosticado alguna infección gastrointestinal?*

		No	Si	Total
Muestra de heces	Negativo para *Escherichia coli* BLEE	20	8	28
	Positivo para *Escherichia coli* BLEE	33	3	36
Total		53	11	64

Elaborado por: Escudero Heredia Steeven Patricio.

Gráfico 31. *Cálculo de la prueba del Chi-cuadrado para validación de un factor de riesgo*

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	4,532[a]	1	,033		
Corrección de continuidad[b]	3,222	1	,073		
Razón de verosimilitud	4,577	1	,032		
Prueba exacta de Fisher				,047	,036
Asociación lineal por lineal	4,461	1	,035		
N de casos válidos	64				

Análisis e interpretación:

Los diagnósticos de infecciones gastrointestinales realizados durante el último año en los trabajadores de las granjas avícolas están relacionados con los reportes de colonización de *E. coli* BLEE, sin embargo 36 trabajadores no fueron diagnosticados con ninguna infección gastrointestinal durante el último año y presentan colonización. A pesar de que algunos pacientes presentaron sintomatología como dolor abdominal, fiebre, entre otras, no es de origen bacteriano, ya que puede ser parasitaria o vírica.

3.2 VALIDACIÓN DE LA HIPÓTESIS

Hipótesis alternativa: Existe colonización de *Escherichia. coli* BLEE y *Salmonella sp.* en trabajadores de granjas avícolas de la Zona 3.

Hipótesis nula: No existe colonización de *Escherichia. coli* BLEE y *Salmonella sp.* en trabajadores de granjas avícolas de la Zona 3.

Tabla 13. *Tabla cruzada para la validación de la hipótesis*

		Grupo control	Grupo experimental	Total
Muestra de heces	Negativo para *Escherichia coli* productora de BLEE y *Salmonella sp*	3	25	28
	Escherichia coli productora de betalactamasas de espectro extendido BLEE	3	33	36
Total		6	58	64

Elaborado por: Escudero Heredia Steeven Patricio

Gráfico 32. Cálculo de la prueba del Chi-cuadrado para validación de hipótesis

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,301[a]	1	,583		
Corrección de continuidad[b]	,084	1	,771		
Razón de verosimilitud	,301	1	,583		
Prueba exacta de Fisher				,615	,385
Asociación lineal por lineal	,296	1	,586		
N de casos válidos	64				

Análisis e interpretación:

En base al reporte de microorganismos identificados en el laboratorio, se determinó la posibilidad de colonización por *E. coli* BLEE y *Salmonella sp.* en trabajadores de granjas avícolas de la Zona 3. Aunque se observó un mayor número de casos de *E. coli* BLEE en el grupo experimental en comparación con el grupo control, los resultados no mostraron una asociación estadísticamente significativa (p=0.385), esto sugiere que

la colonización de *E. coli* BLEE en los trabajadores no puede atribuirse exclusivamente a la práctica laboral en granjas avícolas. Es posible que los trabajadores hayan adquirido la colonización por *E. coli* BLEE en otros entornos fuera del ámbito laboral, como en sus hogares, el consumo de alimentos contaminados o el contacto con fuentes ambientales externas.

3.3 DISCUSIÓN

En la presente investigación realizada durante el período septiembre 2024 – febrero 2025 se identificó una elevada prevalencia de *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) reportando 36/64 (56%) cepas de trabajadores de granjas avícolas de la Zona 3, particularmente en galponeros y aboneros. Estos datos concuerdan con Ortega et al., en su estudio realizado en Ecuador, en el cuál reportan un porcentaje de 48,3 % de colonización de este microorganismo en humanos, al igual que los resultados presentados en el estudio de Falgenhauer et al., realizado en Ghana con una prevalencia de 33/54 (61%) cepas de *E. coli* BLEE en muestras de heces de niños con antecedentes de contacto directo con aves de corral [28]. La similitud presentada en torno a la prevalencia de colonización identificada en los diferentes estudios se debe a la exposición de los humanos con animales destinados a la producción de alimentos. Además, la bacteria descrita se ha posicionado como un microorganismo de origen comunitario debido a su rápida diseminación en la población [29].

El Instituto Nacional de Investigación Pública (INSPI) y el Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos (CRN-RAM) muestra a *E. coli* como parte de los microorganismos multirresistentes de interés nacional perteneciente a la familia de Enterobacterales, que de acuerdo al sistema de vigilancia epidemiológica corresponde el principal grupo de bacterias productoras de β-Lactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en el país[50]. Esta situación es preocupante, y de acuerdo al reporte anual de susceptibilidad antibiótica periodo 2022 del CRN-RAM, a nivel ambulatorio existe un ascenso en la diseminación de microorganismos resistentes como: *Escherichia coli* (58,17%), *Klebsiella pneumoniae* (7,51%) y *Staphylococcus aureus* (4,55%). Por consecuente, *E. coli* representa un desafío en el tratamiento clínico ya que la automedicación, portación asintomática y prácticas laborales (contacto directo con animales) inducen el desarrollo de infecciones, las cuáles pueden complicarse

debido a la resistencia a múltiples antibióticos presentada por este microrganismo, además de estar vinculada con el ascenso de la morbilidad y mortalidad en la población afectada[51].

Por otro lado, no se registró ningún paciente colonizado por *Salmonella sp.*, lo cual destaca *e*l cumplimiento de las directrices establecidas por Agrocalidad mediante el seguimiento de guías de buenas prácticas avícolas, en las cuales de acuerdo al Capitulo IX: "DE LA SALUD, SEGURIDAD, BIENESTAR LABORAL Y DEL MANEJO AMBIENTAL", las avícolas deben regirse a un estricto control sanitario por entes reguladores que aseguren la salud y seguridad de los trabajadores mediante la aplicación de normas de bioseguridad y prevención de enfermedades zoonóticas como la salmonelosis[52]. No obstante, en el estudio realizado por Sánchez et al., en granjas avícolas en Ecuador, hubo un predominio de *S. infantis* del 94,4% en muestras de alimento y en el entorno de los animales, las cuales presentaron un perfil de resistencia a múltiples antibióticos (MDR), con coexistencia del gen de resistencia BLEE ($bla_{CTX\text{-}M\text{-}65}$) y los genes de resistencia a tetraciclina *tetA* y sulfonamidas *sul1*, siendo la principal vía de contaminación cruzada en la cadena de producción avícola[4].

Como parte de la caracterización fenotípica de las cepas de *E. coli* se realizó el test de sinergia con un inhibidor como prueba confirmatoria de BLEE, siendo positiva en los 36 aislamientos en estudio, donde se registraron elevados porcentajes de resistencia a cefalosporinas de tercera generación (C3G) como cefotaxima y ceftriaxona (92%) pero un marcado grado de sensibilidad para Ceftazidima (68%). Esto se asemeja con el trabajo investigativo de Coral, Yauri & Alcocer quienes en su estudio realizado a partir de aislamientos bacterianos clínicos en cepas de *E. coli* BLEE también mostraron un nivel significativo de resistencia para Ceftriaxona (81,82%) [41].

Además, cefoxitina al ser usado como un marcador para identificar AmpC, en la presente investigación en 2 cepas (6%) no se evidenció un halo de inhibición para este fármaco, indicativo de que se son betalactamasas tipo AmpC, que posiblemente coexisten con las de tipo BLEE, las cuáles una de ellas es resistente a ceftazidima y otra tiene susceptibilidad intermedia.[31,41]. De manera similar a lo expuesto, en el estudio de Vinueza et al, en aislamientos de *E. coli* BLEE/AmpC de granjas avícolas del Ecuador se observaron diferencias significativas para Ceftazidima, con un mayor predominio de no susceptibilidad a este antibiótico del 93,9% en cepas con

betalactamasas tipo AmpC y 29,1% para las de tipo BLEE [8]. Aunque ceftazidima presente sensibilidad para algunas cepas bacterianas se debe tomar en cuenta que al tratarse de microorganismos productores de BLEE, el uso de este fármaco o de otro perteneciente a la familia de las cefalosporinas que también sea susceptible in vitro se debe evitar por el posible fracaso terapéutico [53].

Todas las cepas bacterianas caracterizadas en el presente estudio fueron susceptibles al grupo de carbapenémicos, en este caso son considerados como la mejor elección terapéutica para microorganismos BLEE, sin embargo, el uso prolongado y la presión selectiva ejercida por este tipo de antimicrobianos sobre las bacterias pueden provocar en un futuro la aparición microorganismos multirresistentes [17].

Por otro lado, teniendo en cuenta que se describieron aislamientos bacterianos productores de BLEE en esta investigación, también se registró resistencia a ciprofloxacina (50%), una fluoroquinolona de segunda generación y gentamicina (17%), un aminoglucósido. Este comportamiento, también se muestra en los valores presentados en el reporte anual de susceptibilidad antibiótica periodo 2022 del 7-RAM, en el que los perfiles de susceptibilidad de *E. coli* en personas con infecciones urinarias de origen ambulatorio registraron el 21,80% de resistencia para gentamicina y 59,33% para ciprofloxacina[51]. En contraste, el valor de gentamicina (47,3%) y ciprofloxacino (72,7%) con el descrito en esta investigación es más elevado en cepas de *E. coli* BLEE analizadas en aves de corral como se evidencia en el estudio de Vinueza y colaboradores, debido al uso de estas familias de antibióticos en la industria avícola como profilaxis para el crecimiento y cuidado de los animales[8].

En este contexto, Rozwandowicz y colaboradores hacen referencia a los perfiles de susceptibilidad de *E. coli* BLEE descritos anteriormente en varios estudios, demostrando en su investigación que los plásmidos conjugativos como *IncF* que albergan genes productores de BLEE también presentan genes codificadores de enzimas modificadoras de aminoglucósidos y genes de resistencia a quinolonas justificando la resistencia a más de un grupo de antibióticos en el microorganismo descrito [53].

En cuanto a la caracterización genotípica de los aislamientos bacterianos se identificó una mayor frecuencia del gen bla$_{CTX\text{-}M,}$ seguido de un genotipo combinado de bla$_{CTX\text{-}}$

$_{M,}$ bla$_{TEM,}$ y una única cepa solo con el gen bla$_{TEM.}$ Está última de acuerdo con el perfil de susceptibilidad evaluado tiene un mecanismo de resistencia múltiple, es decir, betalactamasas tipo AmpC y BLEE, este fenómeno suele ocurrir cuando se presenta una combinación de genes bla$_{TEM, CMY2}$, siendo bla$_{CMY2}$ el gen más frecuente de AmpC particularmente en cultivos positivos para *E. coli*[27]. No obstante, no se presentó ningún microorganismo con el gen bla$_{SHV}$,además en una de las cepas no se registró ninguno de los genes caracterizados. En este sentido, Falgenhauer et al.,[28] demuestran en su investigación que los genes productores de BLEE más comunes son bla$_{CTX-M15}$ en humanos y aves de corral, pero bla$_{SHV-12}$ únicamente se ha visto presente en pollos de engorde, esto también hace referencia a que se debería considerar el estudio de genes específicos en base a su subclasificación.

Al igual que en la presente investigación se encontró un predominio del 69% del gen bla$_{CTX-M}$, en el estudio de Coral y colaboradores, realizado en Ecuador a partir de aislamientos clínicos bacterianos se identificó el gen mencionado en un 50% [41]. A diferencia del estudio de Falgenhauer et al., mencionado anteriormente, se registró un 97% de prevalencia de manera específica para el gen bla$_{CTX-M-15}$ [28]. Pese a las diferencias en la prevalencias de genes entre estudios el de la presente investigación al tener un genotipo combinado con bla$_{TEM}$ y bla$_{CTX-M}$, este último sigue siendo el de mayor frecuencia.

Además, en el estudio de Vinueza et al., también se muestra un mayor predominio del 90,9% del gen bla$_{CTX-M}$ en aislamientos de *E. coli BLEE*, caracterizados por la resistencia a Cefotaxima [54]. Este comportamiento se debe a que este tipo de betalactamasas poseen la capacidad de hidrolizar de mejorar forma a Cefotaxima que Ceftazidima debido a la afinidad del antibiótico hacia el centro activo de la enzima. Cabe destacar que también tiene un buen efecto de hidrólisis para Cefepime y Aztreonam [38] como se describió en esta investigación con un elevado estado de sensibilidad dosis dependiente para Cefepime (48%) y resistencia variable al Aztreonam, con un 32% de susceptibilidad intermedia y 12% de resistencia para este fármaco.

Por otro lado, en 9 cepas de *Escherichia coli* BLEE (25%), se identificó una combinación de genes (bla$_{CTX-M}$ y bla$_{TEM}$) en su estructura molecular. Esto hace referencia a una propagación de resistencia antimicrobiana debido a elementos

genéticos móviles como integrones y plásmidos que permiten la coexistencia de más de un gen de resistencia a los antibióticos en un microorganismo y su transferencia a diversos géneros bacterianos [20]. Dado es el caso del estudio de Vinueza et al., mencionado anteriormente en el que aislados de *E. coli* resistentes a cefotaxima se presentó un 90,9% microorganismos bacterianos con el gen bla$_{CTX-M}$, pero con la particularidad de que el 43,6% de estos poseen alelos bla$_{TEM-1A}$ o bla$_{TEM-1B}$ y 8,2% con el alelo bla$_{SHV-153}$ [8].

En el estudio investigativo de Moser et al, se demuestra el papel de los elementos genéticos móviles en la propagación de *E. coli* resistente a antimicrobianos de pollos a humanos en zonas rurales de Ecuador, evidenciando que aislamientos bacterianos de ambas poblaciones están asociadas debido a una elevada probabilidad (OR ajustado = 2,0) de portar un integrón que capte genes de resistencia y consecuentemente la transferencia de este microorganismos debido a la interacción entre humanos y aves de corral [20]. En contraste con esta información, en la presente investigación, pese a que se reportó una elevada prevalencia de colonización de *E. coli* BLEE, no se identificó una asociación estadísticamente significativa (p=0.385) entre las variables analizadas, esto demuestra que no puede atribuirse la colonización bacteriana en el personal de la granja exclusivamente a la práctica laboral.

De igual forma la mayoría de los factores de riesgo presentados en la encuesta no estuvieron correlacionados, a excepción de los diagnósticos de infecciones gastrointestinales durante el último año, ya que gran parte de los individuos que presentaron esta bacteria no padecieron ninguna afección gastrointestinal. Por consecuente, hace alusión a una portación asintomática de este microrganismo bacteriano como un equilibrio dinámico entre el hospedador y el huésped (*E. coli*)[11].

Cabe resaltar que el 58% de la población menciona tener animales domésticos (gatos, perros, etc.) en sus hogares, por lo que, el contacto directo con estos animales, sobre todo con sus desechos, está relacionado con una transmisión zoonótica de microorganismos bacterianos. De este modo, según el estudio de Ortega y colaboradores reportaron la presencia del 40% de cepas de *E. coli* resistente a ceftriaxona en heces caninas en la ciudad de Quito, con fenotipos multirresistentes que albergan la presencia de genes como: bla$_{CTX-M-15}$, bla$_{CTX-M-55}$, bla$_{CTX-M-65}$, bla$_{CMY-2}$ e incluso *mcr-1* y bla$_{CTX-M-65}$ conjuntamente[55]. Además se tomó en cuenta como un

factor importante al período de tiempo de trabajo en las granjas, haciendo referencia al personal eventual en este estudio, particularmente aboneros representando el 31% de pacientes colonizados, por consiguiente, el repentino cambio de trabajadores, la falta de conocimiento y la condición de salud de cada individuo también propician la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos a nivel gastrointestinal [11].

En esta investigación la situación descrita hace referencia a reservorios compartidos en los cuáles el ser humano actúa como un vínculo entre *E. coli* BLEE y las aves de corral, de tal modo que, al interactuar a diario con estos animales, puede producirse una alteración de la microbiota de las aves, adquisición de factores de virulencia y eventualmente el desarrollo de mecanismos de resistencia, por consiguiente, esta dinámica se convierte en un ciclo permanente de propagación de microorganismos multirresistentes [11,18]. Así que, las granjas avícolas no dejan de ser un importante reservorio de bacterias multirresistentes a los antimicrobianos ya que *E. coli* es el principal patógeno identificado en aves de corral con producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y betalactamasas tipo AmpC mediadas por plásmidos[19,54].

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

Se caracterizaron fenotípicamente y genotípicamente 36 cepas de *Escherichia coli* BLEE de trabajadores avícolas de la Zona 3. No obstante, no se encontró ningún aislamiento positivo para *Salmonella sp.* debido al correcto cumplimiento de las directrices establecidas por Agrocalidad, a través de los controles periódicos en granjas avícolas para evitar la transmisión de enfermedades zoonóticas como la salmonelosis y mantener la seguridad/salud de los trabajadores.

Se identificaron mediante microbiología convencional (cultivos selectivos y pruebas bioquímicas) 36 cepas de *E. coli* productora de BLEE en aislamientos de materia fecal en los trabajadores de las granjas avícolas, sin embargo, no se registró ningún aislamiento bacteriano para *Salmonella sp.*

Se determinó el perfil de susceptibilidad a los antibióticos en las cepas de *E. coli* BLEE, describiendo un elevado porcentaje de resistencia a cefalosporinas de tercera generación como Ceftriaxona/Cefotaxima, pero con menor poder de hidrólisis para Ceftazidima y en menor proporción fluoroquinolonas y aminoglucósidos, pero con sensibilidad hacia los carbapenémicos.

Se caracterizaron genotípicamente las 36 cepas de *E. coli* BLEE mediante la reacción en cadena de la polimerasa, identificando un predominio del gen bla$_{CTX-M}$ (69%), una combinación de genes bla$_{CTX-M}$ y bla$_{TEM}$, (25%) y la ausencia de microorganismos con el gen bla$_{SHV}$

Se asociaron los factores de riesgo presentados en la encuesta a los trabajadores avícolas con la colonización de *E. coli* BLEE, pero en su mayoría, no presentaron asociación significativa, a excepción de los diagnósticos de infecciones gastrointestinales realizados durante el último año, en los cuáles no presentaron dicha afección pese a los sintomatología mencionada (dolor abdominal y fiebre), la cual no hace referencia a una infección de etiología bacteriana. De modo que, se trata de una portación asintomática de *E, coli* BLEE en la población descrita, ya que dicho

fenómeno hace referencia a reservorios compartidos en los cuáles el ser humano actúa como un vínculo entre *E. coli* BLEE y las aves de corral.

4.2 RECOMENDACIONES

- Se sugiere realizar la complementariedad de este estudio en el que intervenga la caracterización fenotípica y genotípica de los microorganismos descritos en el componente humano, animal y alimentario para identificar posibles asociaciones y determinar la prevalencia de BLEE y AmpC en bacterias multirresistentes.
- Realizar charlas preventivas en el personal de las granjas avícolas en cuanto a las consecuencias del uso prolongado de antibióticos y la automedicación debido a la naturaleza de su práctica laboral para prevenir el desarrollo de resistencia antimicrobiana.
- Es de vital importancia manejar este tipo de datos como información útil para el desarrollo de reportes epidemiológicos que ayuden a identificar la panorámica actual de la aparición de bacterias multirresistentes en la industria avícola a nivel local.
- Es importante que la industria avícola aplique medidas de intervención efectivas durante la producción alimentos de origen animal con la continua aplicación de medidas de bioseguridad y la reducción del uso de antibióticos de amplio espectro.

REFERENICAS BIBLIOGRÁFICAS

1. You Y, Silbergeld EK. Learning from agriculture: Understanding low-dose antimicrobials as drivers of resistome expansion. Front Microbiol. 2014;5.

2. Lazarus B, Paterson DL, Mollinger JL, Rogers BA. Do human extraintestinal escherichia coli infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins originate from food-producing animals? A systematic review. Vol. 60, Clinical Infectious Diseases. 2015.

3. Abushaheen MA, Muzaheed, Fatani AJ, Alosaimi M, Mansy W, George M, et al. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. Disease-a-Month. 2020;66(6).

4. Sánchez-Salazar E, Gudiño ME, Sevillano G, Zurita J, Guerrero-López R, Jaramillo K, et al. Antibiotic resistance of Salmonella strains from layer poultry farms in central Ecuador. J Appl Microbiol. 2020;128(5).

5. Apostolakos I, Mughini-Gras L, Fasolato L, Piccirillo A. Assessing the occurrence and transfer dynamics of ESBL/pAmpC-producing Escherichia coli across the broiler production pyramid. PLoS One. 2019;14(5).

6. Roth N, Käsbohrer A, Mayrhofer S, Zitz U, Hofacre C, Domig KJ. The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in Escherichia coli: A global overview. Vol. 98, Poultry Science. 2019.

7. Koga VL, Scandorieiro S, Vespero EC, Oba A, De Brito BG, De Brito KCT, et al. Comparison of Antibiotic Resistance and Virulence Factors among Escherichia coli Isolated from Conventional and Free-Range Poultry. Biomed Res Int. 2015;2015.

8. Vinueza-Burgos C, Ortega-Paredes D, Narvaéz C, De Zutter L, Zurita J. Characterization of cefotaxime resistant Escherichia coli isolated from broiler farms in Ecuador. PLoS One. 2019;14(4):1-14.

9. Foley SL, Nayak R, Hanning IB, Johnson TJ, Han J, Ricke SC. Population

dynamics of Salmonella enterica serotypes in commercial egg and poultry production. Vol. 77, Applied and Environmental Microbiology. 2011.

10. Moraes DMC, Almeida AMDS, Andrade MA, Nascente E de P, Duarte SC, Nunes IA, et al. Antibiotic Resistance Profile of Salmonella sp. Isolates from Commercial Laying Hen Farms in Central-Western Brazil. Microorganisms. 2024;12(4):1-15.

11. Álvarez J, Fernández Real JM, Guarner F, Gueimonde M, Rodríguez JM, Saenz de Pipaon M, et al. Microbiota intestinal y salud. Gastroenterol Hepatol [Internet]. 2021;44(7):519-35. Disponible en: https://www.elsevier.es/es-revista-gastroenterologia-hepatologia-14-articulo-microbiota-intestinal-salud-S0210570521000583

12. Marmion M, Ferone MT, Whyte P, Scannell AGM. The changing microbiome of poultry meat; from farm to fridge. Vol. 99, Food Microbiology. 2021.

13. Conave. Estadísticas Del Sect Avícola [Internet]. 2023. Disponible en: https://conave.org/informacion-sector-avicola-publico/

14. AGROCALIDAD, Vásquez JEÁ. Lista De Centros De Faenamiento Habilitados Mediante La Certificación De Matadero Bajo Inspección Oficial - Mabio [Internet]. MInisterio de Agricultura y Ganadería. 2020. Disponible en: https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2021/02/LISTA-MABIO-AL-30-12-2020.pdf

15. Ecuador es el primer país en el mundo en generar un nuevo programa de formación con enfoque One Health – Ministerio de Salud Pública [Internet]. [citado 6 de octubre de 2024]. Disponible en: https://www.salud.gob.ec/ecuador-es-el-primer-pais-en-el-mundo-en-generar-un-nuevo-programa-de-formacion-con-enfoque-one-health/

16. About One Health | One Health | CDC [Internet]. [citado 6 de octubre de 2024]. Disponible en: https://www.cdc.gov/one-health/about/index.html#cdc_generic_section_3-how-does-a-one-health-approach-work

17. López V, Guerriero L, Elorza V, Krüger A, Colello R, Casado P, et al. Resistencia a antimicrobianos en bacterias aisladas en la cadena de producción avícola. InVet. 2021;23(1668-3498).

18. Maciel-Guerra A, Baker M, Hu Y, Wang W, Zhang X, Rong J, et al. Dissecting microbial communities and resistomes for interconnected humans, soil, and livestock. ISME J. 2023;17(1):21-35.

19. Tofani S, Albini E, Blasi F, Cucco L, Lovito C, Maresca C, et al. Assessing the Load, Virulence and Antibiotic-Resistant Traits of ESBL/Ampc E. coli from Broilers Raised on Conventional, Antibiotic-Free, and Organic Farms. Antibiotics. 2022;11(11).

20. Moser KA, Zhang L, Spicknall I, Braykov NP, Levy K, Marrs CF, et al. The Role of Mobile Genetic Elements in the Spread of Antimicrobial-Resistant Escherichia coli from Chickens to Humans in Small-Scale Production Poultry Operations in Rural Ecuador. Am J Epidemiol. 2018;187(3):558-67.

21. Van Hoek AHAM, Veenman C, Florijn A, Huijbers PMC, Graat EAM, De Greeff S, et al. Longitudinal study of ESBL Escherichia coli carriage on an organic broiler farm. J Antimicrob Chemother. 2018;73(12).

22. Becker E, Projahn M, Burow E, Käsbohrer A. Are there effective intervention measures in broiler production against the esbl/ampc producer escherichia coli? Vol. 10, Pathogens. 2021.

23. Liljebjelke KA, Hofacre CL, White DG, Ayers S, Lee MD, Maurer JJ. Diversity of antimicrobial resistance phenotypes in Salmonella isolated from commercial poultry farms. Front Vet Sci. 2017;4(JUN).

24. Zeng H, De Reu K, Gabriël S, Mattheus W, De Zutter L, Rasschaert G. Salmonella prevalence and persistence in industrialized poultry slaughterhouses. Poult Sci. 2021;100(4).

25. Wang X, Wang H, Li T, Liu F, Cheng Y, Guo X, et al. Characterization of Salmonella spp. isolated from chickens in Central China. BMC Vet Res.

2020;16(1).

26. Ngai DG, Nyamache AK, Ombori O. Prevalence and antimicrobial resistance profiles of Salmonella species and Escherichia coli isolates from poultry feeds in Ruiru Sub-County, Kenya. BMC Res Notes. 2021;14(1).

27. Primeau CA, Bharat A, Janecko N, Carson CA, Mulvey M, Reid-Smith R, et al. Integrated surveillance of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Salmonella and Escherichia coli from humans and animal species raised for human consumption in Canada from 2012 to 2017. Epidemiol Infect. 2023;151.

28. Falgenhauer L, Imirzalioglu C, Oppong K, Akenten CW, Hogan B, Krumkamp R, et al. Detection and characterization of ESBL-producing Escherichia coli from humans and poultry in Ghana. Front Microbiol. 2019;10(JAN).

29. Jang J, Hur HG, Sadowsky MJ, Byappanahalli MN, Yan T, Ishii S. Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications—a review. J Appl Microbiol. 2017;123(3):570-81.

30. Foley SL, Johnson TJ, Ricke SC, Nayak R, Danzeisen J. Salmonella Pathogenicity and Host Adaptation in Chicken-Associated Serovars. Microbiol Mol Biol Rev. 2013;77(4).

31. Calvo J, Cantón R, Fernández F, Mirelis B, Navarro F. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos, SEIMC [Internet]. Seimc. 2011. 54 p. Disponible en: https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia38.pdf

32. TM MEDIA. Product Data Sheet TM 336 – EMB AGAR. 2019.

33. TM MEDIA. Product Data Sheet TM 492 – XLD AGAR. 2019.

34. Carroll KC, Hobden JA, Miller S, Morse SA, Mietzner TA, Detrick B, et al. Microbiología médica. 27.ª ed. Mexico D.F.: McGraw-Hill Interamericana; 2016. 866 p.

35. Huemer M, Mairpady Shambat S, Brugger SD, Zinkernagel AS. Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. EMBO Rep. 2020;21(12).

36. Moreno C, González R, Beltrán C. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. Antimicrobial resistance mechanisms in respiratory pathogens. Rev Otorrinolaringol Cir Cabeza Cuello. 2009;69(2):185-92.

37. Kawamura K, Nagano N, Suzuki M, Wachino J ichi, Kimura K, Arakawa Y. ESBL-producing *Escherichia coli* and Its Rapid Rise among Healthy People. Food Saf. 2017;5(4).

38. Ghafourian S, Sadeghifard N, Soheili S, Sekawi Z. Extended spectrum beta-lactamases: Definition, classification and epidemiology. Curr Issues Mol Biol. 2014;17(1).

39. Prats G. Microbiología Clínica. 1.ª ed. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana; 2005. 354 p.

40. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29.ª ed. Clinical & Laboratory Standards Institute. 2020.

41. Coral D, Yauri Bucheli MF, Alcocer I. Caracterización molecular de genes de resistencia a β-lactámicos en aislados bacterianos clínicos de la familia Enterobacteriaceae. Rev Ecuat Med Cienc Biol. 2021;42(1):63-77.

42. Vázquez A, Morales A. Microsatélites. Herramientas Mol Apl en Ecol. 2014;

43. Lestari R, Nasrul AA, Pitaloka KD, Hendrayanti D. The effect of various temperatures of heat shock method to the DNA concentration of filamentous strains Cyanobacteria. En: AIP Conference Proceedings. 2019.

44. Padrón López RM, Hernández Marín A, Lesher Gordillo JM. HISTORIA Y APLICACIONES DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO. Kuxulkab'. 2022;28(61).

45. Illinois Department of Public Health. Instrucciones para recolección de muestra

de heces. 2019;1. Disponible en: http://dph.illinois.gov/sites/default/files/resources/stoolcollectioncary-vialsp.pdf

46. Olmos AF, Fuente CG de la, Nieto JAS, Ramos SV. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Vol. 29, Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica. https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf; 2011. 601-608 p.

47. Dierikx C, van Essen-Zandbergen A, Veldman K, Smith H, Mevius D. Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing Salmonella enterica and Escherichia coli isolates from poultry. Vet Microbiol. 2010;145(3-4).

48. Maynard C, Fairbrother JM, Bekal S, Sanschagrin F, Levesque RC, Brousseau R, et al. Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic Escherichia coli O149: K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(10):3214-21.

49. Alyamani EJ, Khiyami AM, Booq RY, Majrashi MA, Bahwerth FS, Rechkina E. The occurrence of ESBL-producing Escherichia coli carrying aminoglycoside resistance genes in urinary tract infections in Saudi Arabia. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2017;16(1):1-13.

50. Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública. Vigilancia de BLEE y Carbapenemasas en Ecuador período 2018-2021. 2022.

51. Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública. Reporte anual de susceptibilidad antibiótica periodo 2022. 2022.

52. Ministerio de Agricultura, Ganadería A y P. Guia de Buenas Practicas Avicolas [Internet]. Agrocalidad. 2020. Disponible en: https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/pecu4.pdf

53. Rozwandowicz M, Brouwer MSM, Fischer J, Wagenaar JA, Gonzalez-Zorn B,

Guerra B, et al. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother. 2018;73(5):1121-37.

54. Ortega-Paredes D, de Janon S, Villavicencio F, Ruales KJ, De La Torre K, Villacís JE, et al. Broiler Farms and Carcasses Are an Important Reservoir of Multi-Drug Resistant Escherichia coli in Ecuador. Front Vet Sci. 2020;7(November):1-8.

55. Ortega-paredes D, Haro M, Leoro-garzón P, Barba P, Loaiza K, Mora F, et al. Multidrug-resistant Escherichia coli isolated from canine faeces in a public park in Quito , Ecuador. J Glob Antimicrob Resist [Internet]. 2019;18:263-8.

56. Tilli G, Laconi A, Galuppo F, Mughini-Gras L, Piccirillo A. Assessing Biosecurity Compliance in Poultry Farms: A Survey in a Densely Populated Poultry Area in North East Italy. Animals. 2022;12(11).

ANEXOS

Anexo 1. *Fotografías del desarrollo del Proyecto de Investigación*

Gráfico 33. *Socialización del Proyecto de Investigación*



Gráfico 34. *Preparación de medios de cultivo y pruebas bioquímicas*



Gráfico 35. *Toma de muestras*



Gráfico 36. *Pre-enriquecimiento de las muestras de heces e hisopados de manos en agua peptonada*

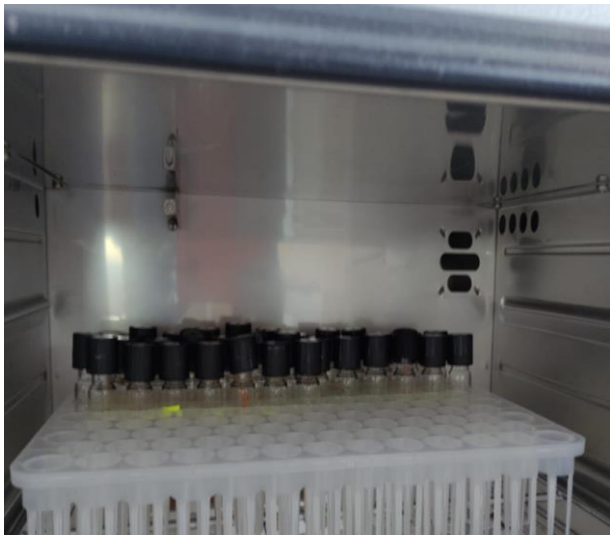


Gráfico 37. *Cultivo e aislamiento bacteriológico*

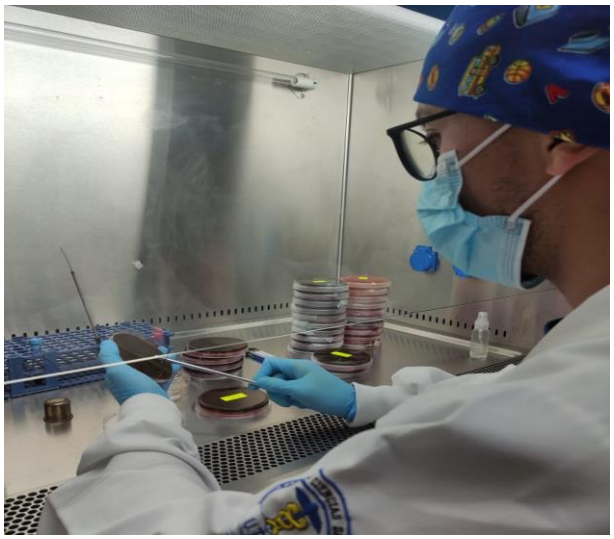


Gráfico 38. *Identificación de Escherichia coli y Salmonella sp. con pruebas bioquímicas*

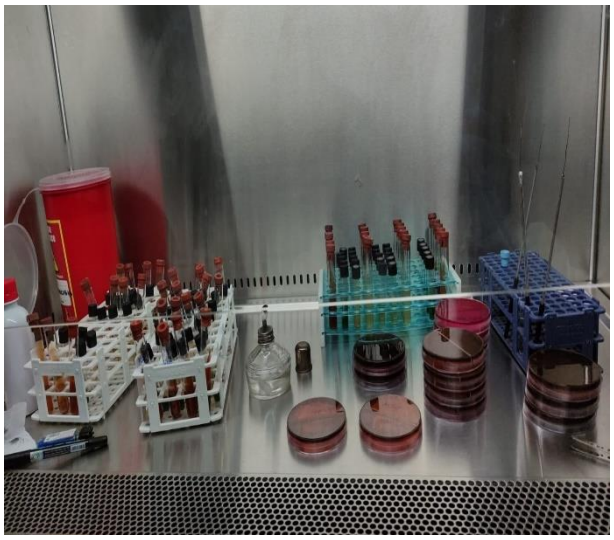


Gráfico 39. *OXOID Turbidometer. Escala 0,5 McFarland*



Gráfico 40. *Lectura e interpretación de la prueba de sinergia con un inhibidor y antibiogramas*

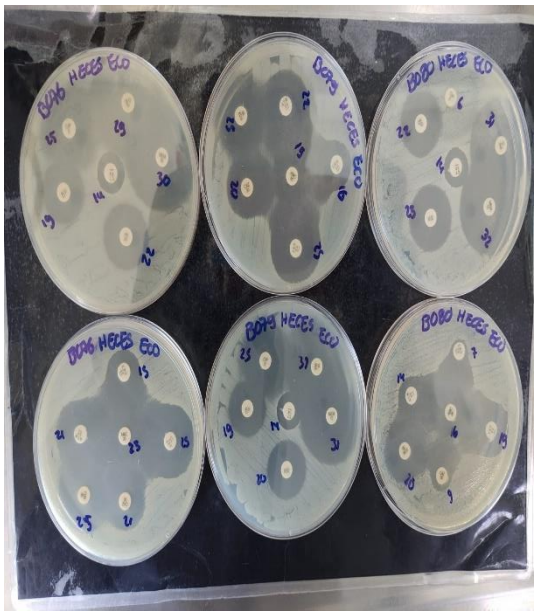


Gráfico 41. *Cepa productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE)*

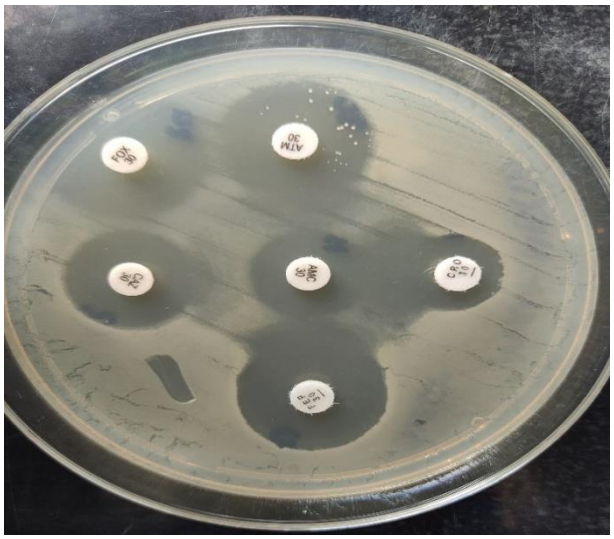


Gráfico 42. *Extracción de ADN bacteriano por shock térmico*



Gráfico 43. *Cuantificación de ADN en el equipo Nanodrop*

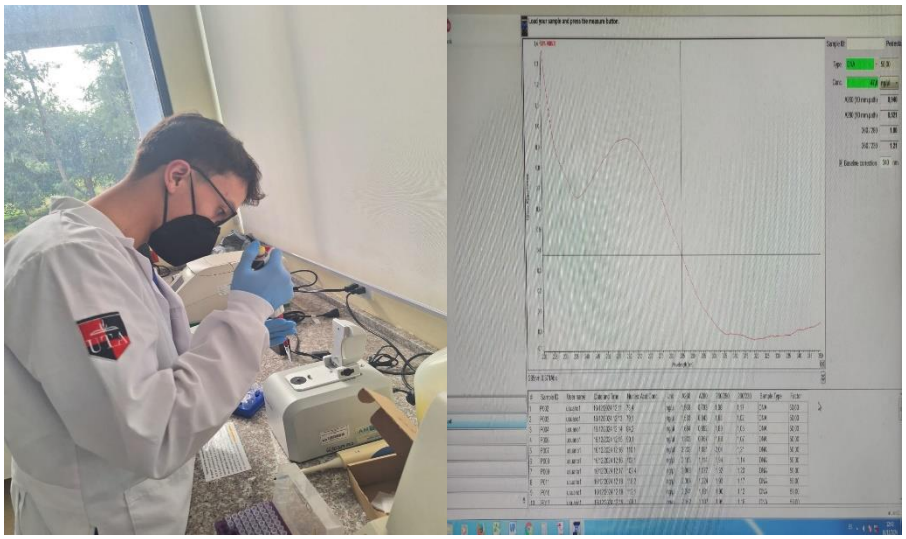


Gráfico 44. *Preparación de la Master Mix y realización de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*



Gráfico 45. *Corrida electroforética*

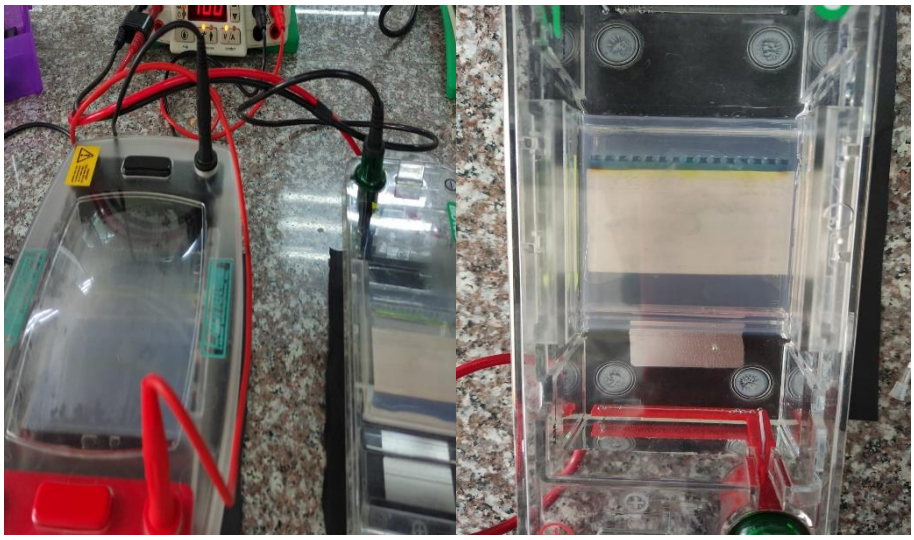
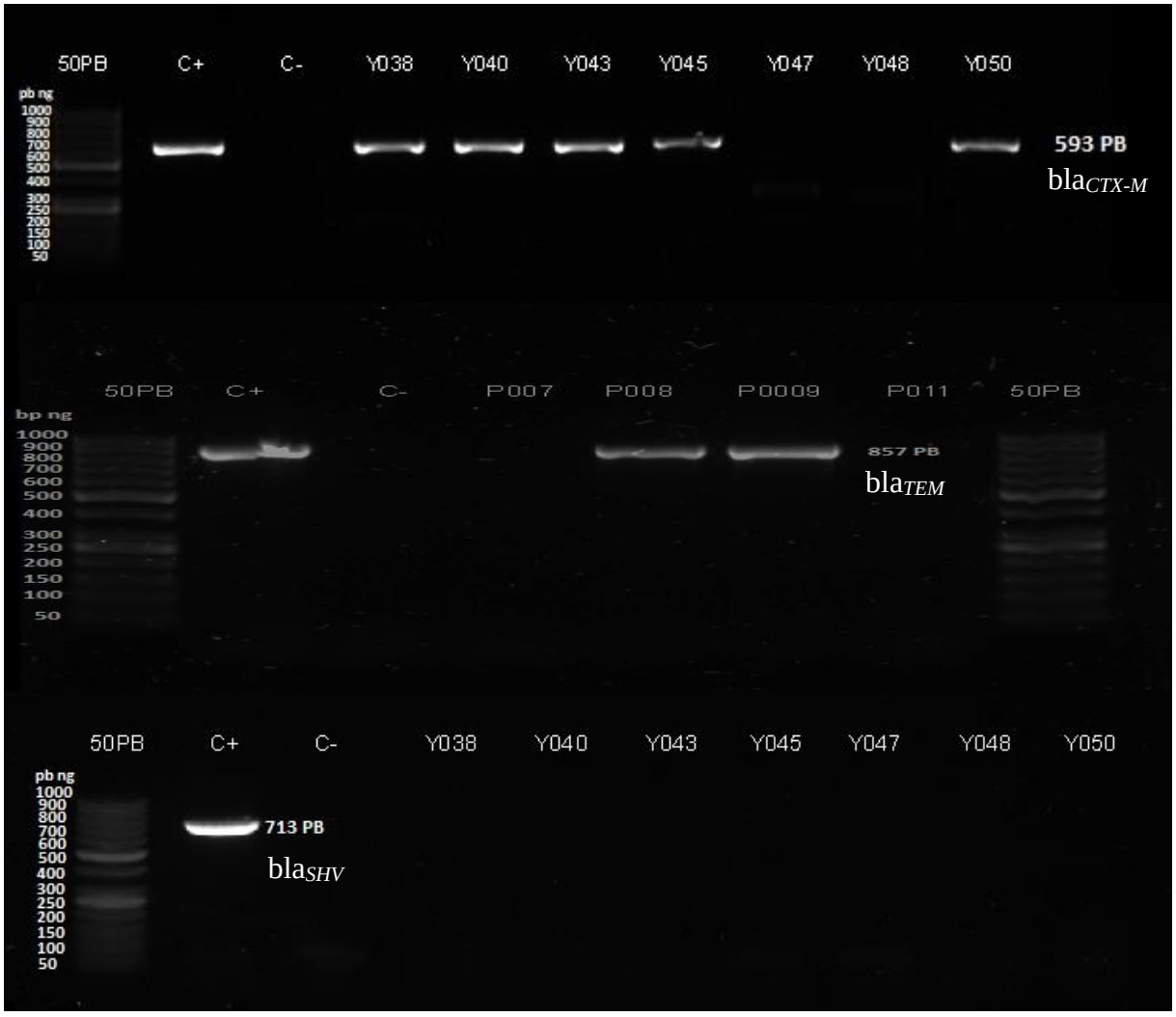


Gráfico 46. *Resultados de la electroforesis de los genes bla$_{CTX-M}$, bla$_{TEM}$ y bla$_{SHV}$*



Anexo 2. *Operacionalización de las variables*

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINCIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	ESCALA	INDICADORES	INSTRUMENTOS DE MEDIDA
Presencia de cepas de *E. coli* BLEE (Variable Dependiente)	**Caracterización Fenotípica Bacteriana:** Morfología macroscópica de la colonia (cultivos), requerimientos nutricionales, ambientales (pruebas bioquímicas) y el nivel de susceptibilidad a los antibióticos (antibiogramas) [31].	Identificación fenotípica de *E. coli* BLEE y *Salmonela sp.*: cultivo de material fecal (Agar EMB suplementado con Ceftriaxona y Agar *XLD*) para el crecimiento de microorganismos gramnegativos resistentes a las cefalosporinas. El aislamiento bacteriano será identificado mediante baterías bioquímicas (requerimientos nutricionales) [31]**.**	**Cultivo para *E. coli:*** • Morfología. • Selectividad de microorganismo BLEE.	• Crecimiento bacteriano (24h). • Sin crecimiento bacteriano: (24h).	• Colonias moradas con brillo verde metálico. • Crecimiento bacteriano: Positivo (BLEE).	Observación y hoja de recolección de datos (Bitácora)
			Cultivo para *Salmonella sp.:* • Morfología.	• Crecimiento bacteriano (24h). • Sin crecimiento bacteriano: (24h).	• Colonias rojas con halo negro brillante en el centro.	

			Baterías bioquímicas *E. coli*:
			• TSI.
			• Citrato.
			• Urea.
			• RM.
			• SIM.
				• Positivo
				• Negativo
					• TSI: A/A.
					• Citrato: (-).
					• Urea: (-).
					• RM: (+).
					• SIM:
					  ○ H_2S: (-).
					  ○ Indol: (+).
					  ○ Motilidad: (+).	

			Baterías bioquímicas *E. coli*: • TSI. • Citrato. • Urea.	• Positivo • Negativo	• TSI: K/A • Citrato: (+). • Urea: (-). • RM: (+). • SIM: ○ H_2S: (+).	

			• RM. • SIM.		○ Indol: (-). ○ Motilidad: (+).	
Susceptibilidad Antimicrobiana (Variable Independiente)	**Susceptibilidad Antimicrobiana y Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE):** • Capacidad de reacción de un microorganismo bacteriano ante el accionar de un antimicrobiano. • Enzimas hidrolíticas contra los betalactámicos (Mecanismo de resistencia antibiótica) [31].	**Susceptibilidad Antimicrobiana:** Antibiograma (Kirby-Bauer) y confirmación mediante el test de sinergia de doble disco [31].	**Antibiograma *E. coli*:** AMC, CAZ, CRO, CTX, FOX, FEP, ATM, CIP, GEN, AMK, COL.	• Resistente. • Intermedio. • Sensible.	Diámetro del halo de inhibición de los antibióticos.	Observación y hoja de recolección de datos (Bitácora)
			Antibiograma *Salmonella sp.*: AZM, FOX, CTX, ETP, IPM, MEM, CIP, LVX.			
			Test de sinergia de doble disco: • AMC. • CAZ. • CRO. • FEP. • ATM.	• Positivo • Negativo	Ampliación del halo de inhibición de las cefalosporinas y ATM próximo a la zona con el disco de AMC (zona fantasma).	Observación y hoja de recolección de datos (Bitácora).
Genes productores de BLEE en cepas *E. coli.* (Variable Independiente)	Identificación de los genes productores de betalactamasas de espectro extendido: bla_{CTX-M}, bla_{SHV} y bla_{TEM} [41].	**Reacción en cadena de la polimerasa:** Amplificación de los genes productores de BLEE: bla_{CTX-M}, bla_{SHV} y bla_{TEM} y su identificación (electroforesis) para	**Genes BLEE:** • bla_{CTX-M}. • bla_{SHV}. • bla_{TEM}.	• Presencia • Ausencia	• Muestras positivas para BLEE de acuerdo al gen identificado. • Porcentajes de la frecuencia relativa.	• Termociclador Bio-RAD T100. • Fotodocumentador ChemiDoc Bio-RAD. • Hojas de cálculo.

		determinar el predominio de cada gen [41].				
Factores de riesgo (Variable Independiente)	Factores de riesgo: Situaciones específicas ante las cuales la población estudiada se encuentra expuesta a la colonización de *Escherichia coli* BLEE y *Salmonella sp.* [56].	Encuesta de relación de los factores de riesgo: factores demográficos, prácticas de higiene personal, medidas de bioseguridad, prácticas laborales y uso de antibióticos [56].	Cuestionario de preguntas sobre los factores de riesgo para la colonización de *Escherichia coli* BLEE y *Salmonella sp*. (Ver en ***Anexo 3***).	Selección múltiple (Ver en ***Anexo 3***).	Cuestionario de preguntas (Ver en ***Anexo 3).***	Encuesta

Anexo 3. *Encuesta de Factores de riesgo*

Encuesta de Factores de Riesgo Asociados a la Colonización de *Escherichia coli* BLEE y *Salmonella sp.*

Proyecto: "Caracterización de *Escherichia coli* BLEE y *Salmonella sp.* en trabajadores de granjas avícolas de la Zona 3"

Estimados participantes,

Su colaboración es de vital importancia ya que contribuirá de manera significativa a mi proyecto de investigación. Lea cuidadosamente cada interrogante presentado y elija la respuesta según corresponda, además les solicito que respondan las preguntas con la mayor sinceridad y honestidad posible, ya que sus aportaciones serán esenciales para la obtención de resultados precisos. Agradezco profundamente su tiempo y valiosa contribución a este estudio.

Edad:

Género: __Masculino __Femenino __Otro

Área de trabajo:

Código del Participante:

1. **¿Cuánto tiempo lleva trabajando en esta unidad?**

☐ Menos de 6 meses.

☐ 6 meses a 1 año.

☐ 1-2 años.

☐ Más de 2 años.

2. **¿Se lava las manos después de manipular animales, productos o fluidos animales?**

☐ Si.

☐ No.

3. **¿Qué tipo de protección personal usa?**

- ☐ Guantes.
- ☐ Mascarilla.
- ☐ Uniforme.
- ☐ Botas.
- ☐ Mandil.
- ☐ Cofia.

4. **Si usa uniforme para sus actividades, ¿se lo retira antes de ir a casa?**

- ☐ Si.
- ☐ No.

5. **¿Tiene contacto directo con los animales?**

- ☐ Si, todos los días.
- ☐ Si, 1 a 3 veces de la semana.
- ☐ No.

6. **¿Ha tenido contacto directo con algún fluido animal? (sangre, heces, orina).**

- ☐ Si.
- ☐ No.

7. **¿Consume usted y/o su familia los productos que se generan en la unidad?**

- ☐ Más de una vez a la semana.
- ☐ Menos de una vez a la semana.
- ☐ No.

8. **¿Qué tipo de animales tiene en su casa?**

- ☐ Animales domésticos (gatos, perros, etc.).
- ☐ Animales de granja (gallinas, cerdos, etc.).

- [ ] No tengo animales.

9. ¿En el último año se le ha diagnosticado alguna infección gastrointestinal?

- [ ] Si.
- [ ] No.

10. ¿Ha presentado alguno de los siguientes síntomas relacionados con una afección gastrointestinal en el último mes? (Marque todos los que apliquen)

- [ ] Diarrea.
- [ ] Náuseas.
- [ ] Vómitos.
- [ ] Dolor abdominal.
- [ ] Fiebre
- [ ] No.

11. ¿En los últimos 6 meses, ¿ha estado usted bajo algún tratamiento antibiótico?

- [ ] Si, más de una vez.
- [ ] Si, una vez.
- [ ] No, he estado bajo ningún tratamiento antibiótico.

12. ¿Sabe usted que el uso prolongado de antibióticos puede inducir el desarrollo de resistencia bacteriana a los antibióticos?

- [ ] Si.
- [ ] No.

¡Gracias por su colaboración!

Anexo 4. *Consentimiento Informado*

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA RECOLECCIÓN, USO Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS Y DATOS PERSONALES

Sección I: INFORMACIÓN PARA EL PARTICIPANTE/REPRESENTANTE LEGAL

Título del estudio: "Caracterización de *Escherichia coli* BLEE y *Salmonella sp.* en trabajadores de granjas avícolas de la Zona 3".

Nombre, dirección y teléfono del Investigador Principal:

Nombre: Escudero Heredia Steeven Patricio.

Dirección: Cdla. Los Molinos del Niágara. Latacunga.

Teléfono: 0981058142.

A) Hoja de información:

Estimado señor(a) le estamos pidiendo que autorice la recolección y uso de muestras de heces necesarias durante la realización del estudio "Caracterización de *Escherichia coli* BLEE y *Salmonella sp.* en trabajadores de granjas avícolas de la Zona 3".

Su participación es completamente voluntaria; puede aceptar participar en el estudio principal y no en esta sección, sin que ello le provoque inconveniente alguno en su atención en salud.

Lea toda la información que se le ofrece en este documento y haga todas las preguntas que necesite al investigador que se lo está explicando, antes de tomar una decisión. También lo alentamos a consultarlo con su familia, amigos y médicos de cabecera.

1) **¿Por qué se realiza este estudio?**

El propósito de esta investigación es "Caracterizar cepas de *Escherichia coli* BLEE y *Salmonella sp.* en trabajadores de granjas avícolas de la Zona 3".

2) ¿Qué pasará si participo de esta parte del proyecto de investigación, luego de que firme este Consentimiento Informado?:

Una vez se haya firmado el Consentimiento informado se procederá de la siguiente manera:

2.1. Se le realizará una encuesta "Encuesta de factores de riesgo", para recabar información acerca de los factores de riesgo que predisponen a la colonización de E. coli BLEE y *Salmonella sp.* en los trabajadores de granjas avícolas de la Zona 3.

2.2. Se colectará muestras de heces en un recipiente hermético de tapa rosca de plástico, bajo criterios de aceptación o rechazo de muestras de heces.

3) ¿Qué riesgos podría tener si participo?

Los riesgos asociados con este procedimiento son generalmente mínimos, sin embargo, pueden incluir molestias en la recolección de la muestra, además de molestias debido a la naturaleza del procedimiento. También hay algún riesgo potencial para su privacidad, a pesar de que se tomarán todas las medidas necesarias para mantener la privacidad de su identidad y la confidencialidad de sus datos personales.

4) ¿Cuánto tiempo me tomará participar en esta parte del estudio? Está previsto que su participación dure (lapso de tiempo).

Está previsto que su participación dure 4 meses durante el ciclo académico.

5) ¿Tendré beneficios por participar?

El estudio planteado es de importancia significativa ya que podrá conocer si Ud. esta colonizado por un microorganismo bacteriano y los factores de riesgo que predisponen su presencia, de este modo, podrá actuar de mejor manera frente a las medidas de bioseguridad.

6) ¿Me darán información sobre los resultados del estudio, luego de su finalización?

Si, por supuesto, una vez culminado el estudio, se le brindará la información necesaria acerca de sus resultados obtenidos.

7) **¿Qué gastos tendré si participo del estudio?**

Ud. no tendrá gasto alguno relacionado a los procedimientos y materiales necesarios para esta investigación. Se cubrirán los gastos médicos siempre y cuando sufra algún daño o lesión relacionada con la investigación. No se cubrirán estudios ni medicamentos que no estén relacionados con el estudio.

8) **¿Qué pasará si sufro algún evento adverso mientras participo en el estudio?**

Si durante el transcurso del mismo usted sufre un daño físico, una lesión o una consecuencia en su salud relacionada con el procedimiento, el investigador Escudero Heredia Steeven Patricio se hará responsable y proveerá toda la asistencia médica inmediata y necesaria para su tratamiento.

9) **¿Puedo dejar de participar en cualquier momento, aún luego de haber aceptado?**

Usted es libre de retirar su consentimiento para participar en esta parte de la investigación en cualquier momento sin que esto lo perjudique en su atención médica posterior; simplemente deberá notificar al investigador de su decisión (por escrito) en caso de que exista alguna inconformidad.

Luego de que retire su consentimiento no se podrá obtener datos sobre Ud. y su salud, pero toda la información obtenida con anterioridad sí será utilizada.

10) **¿Puedo retirar mi consentimiento para la utilización de muestras biológicas, aún luego de haber aceptado? (sólo si aplica, caso contrario poner No aplica)**

Si Ud. ha dado su autorización para almacenar sus muestras biológicas (heces) para estudios a realizarse en el futuro, puede cambiar de opinión en cualquier momento. Debe notificar al investigador a cargo del estudio (por escrito) sobre su decisión.

11) **¿Cómo mantendrán la confidencialidad de mis datos / muestra?**

Como parte de la protección de datos en investigación de seres humanos y la utilización de muestras biológicas, se preservará la confidencialidad de los datos y muestras de los participantes en el estudio planteado, a través de la implementación de medidas como la anonimización completa de la información identificable, mediante el uso de códigos alfanuméricos, y almacenamiento seguro de los datos con acceso restringido netamente para uso investigativo. En este contexto, se obtiene el consentimiento informado de los participantes, detallando de manera clara las prácticas de confidencialidad establecidas. Asimismo, se limitará el acceso a los datos a miembros autorizados del equipo de investigación y mantendrá un periodo limitado de retención de los mismos con el fin de garantizar el cumplimiento de estándares éticos. Estas medidas aseguran la protección de la privacidad de los participantes durante la fase de investigación y duración del proyecto.

12) ¿Cómo, dónde y por cuánto tiempo se almacenarán mis datos/ muestras? ¿Cómo las destruirán luego de su utilización?

Sus muestras serán procesadas una vez hayan sido recolectadas según el cronograma establecido por el investigador. En cuanto a los datos obtenidos serán almacenados en una base de datos digital con la finalidad del análisis de sus resultados y tabulación de la información para el proceso investigativo durante el período de duración del proyecto. Después de este período serán destruidos con los métodos que cumplan con los procedimientos del laboratorio y de la institución.

Se le pedirá que indique si desea que las muestras no utilizadas sean destruidas o que se las vuelva anónimas en el caso que no lo sean (o sea, se les retire toda información que pueda relacionarlas con Ud.) para su posterior utilización en otra investigación.

Toda información que se haya obtenido hasta el momento en que retire su consentimiento será usada, pero no se obtendrá ningún otro dato.

13) ¿Puedo ser retirado del estudio aún si yo no quisiera?

El investigador, el comité de ética, que supervisan el estudio pueden decidir retirarlo si consideran que es lo mejor para usted. También pueden decidir

retirarlo por las siguientes causas: Si no desea participar en el proyecto, si no se cumplen los requisitos establecidos particularmente la administración de un tratamiento antibiótico durante la fase de investigación.

14) ¿Me pagarán por participar?

No se le pagará por su participación en este estudio. Sólo se le cubrirán los materiales necesarios para la toma de muestras, en este caso un recipiente hermético de tapa rosca de plástico.

15) ¿Cómo mantendrán la confidencialidad de mis datos personales? ¿Cómo harán para que mi identidad no sea conocida?

Los datos que lo identifiquen serán tratados en forma confidencial como lo exige la Ley. Salvo para quienes estén autorizados a acceder a sus datos personales, Ud. no podrá ser identificado y para ello se le asignará un código alfanumérico. En caso de que los resultados de este estudio sean publicados en revistas médicas o presentados en congresos médicos, su identidad no será revelada.

El titular de los datos personales (o sea usted) tiene la facultad de ejercer el derecho de acceso a los mismos en forma gratuita a intervalos no inferiores a seis meses, salvo que se acredite un interés legítimo al efecto conforme lo establecido en la Ley, tiene la atribución de atender las denuncias y reclamos que se interpongan con relación al incumplimiento de las normas sobre protección de datos personales.

16) ¿Quiénes tendrán acceso a mis datos personales?

Como parte del estudio, el Investigador Principal y todo el equipo de investigación tendrán acceso a los resultados de sus estudios, como parte del análisis del laboratorio.

17) ¿A quiénes puedo contactar si tengo dudas sobre el estudio y mis derechos como participante en un estudio de investigación?

17.1. **Sobre el estudio: contactar al Investigador Principal:** Steeven Patricio Escudero Heredia en la Cdla. Los Molinos del Niágara de la ciudad de Latacunga o al teléfono celular 0981058142.

17.2. **Sobre sus derechos como participante en un estudio de investigación:**

El presente trabajo de investigación ha sido evaluado por el CISH-UTA. Si Usted tiene alguna pregunta relacionada con sus derechos como participante en la investigación puede contactarse con el Investigador principal Steeven Patricio Escudero Heredia (sescudero1169@uta.edu.ec), o presidente del CISH, Dra. Aida Fabiola Aguilar Salazar (gaguilar0680@uta.edu.ec)

SECCIÓN II: CONSENTIMIENTO INFORMADO

A. DECLARATORIA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo _____ como participante/representante legal de _____., declaro que ha leído el documento de consentimiento, que he comprendido los riesgos y beneficios de participar, el responsable ha respondido a todas mis preguntas, mediante explicación satisfactoria, conozco que mi participación es voluntaria, por lo que consiento libremente participar en los procedimientos propuestos en el estudio, sé que tengo el derecho de retirarme de la investigación en cualquier momento, sin que esto afecte las atenciones a las que tengo derecho, solamente debo informar al investigador.

Al firmar el documento de consentimiento informado, en calidad de: _____

(participante/representante legal de……) NO renuncio a ninguno de los derechos que por ley me corresponden. Se le entregará una copia de este documento al participante/representante legal, una vez suscrito el mismo por las partes.)

FECHA DD/MM/AAA	***NOMBRES COMPLETOS DEL PACIENTE***	***CÉDULA DE IDENTIDAD***	***FIRMA***