



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

TEMA

“Determinación de la presencia de genes de resistencia a betalactámicos y evaluación de diversidad clonal en aislados de *Escherichia coli* de origen canino de la ciudad de Ambato”

“Documento final del Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previa la obtención del Título de Médico Veterinario y Zootecnista, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato a través de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.”

AUTOR

Xiomara Sthefanny Garcés Arias

TUTOR

William Ricardo Calero Cáceres, PhD

CEVALLOS - ECUADOR

2019

APROBACIÓN DEL TUTOR

William Ricardo Calero Cáceres, PhD.

CERTIFICA

Que el presente trabajo de titulación denominado “DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE GENES DE RESISTENCIA A BETALACTÁMICOS Y EVALUACIÓN DE DIVERSIDAD CLONAL EN AISLADOS DE *Escherichia coli* DE ORIGEN CANINO DE LA CIUDAD DE AMBATO” ha sido minuciosamente revisado. Por lo tanto, se autoriza la presentación de este trabajo de Titulación bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.

Cevallos, 24 de diciembre del 2019

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'William Calero', is written over a horizontal dotted line. The signature is enclosed within a large, hand-drawn oval shape.

William Ricardo Calero Cáceres, PhD.

C.I. 171434885-9

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Xiomara Sthefanny Garcés Arias, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del Título de Médica Veterinaria y Zootecnista, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Xiomara Sthefanny Garcés Arias

C.I. 160063408-1

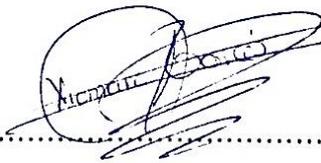
AUTORA

DERECHOS DE AUTOR

“Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE GENES DE RESISTENCIA A BETALACTÁMICOS Y EVALUACIÓN DE DIVERSIDAD CLONAL EN AISLADOS DE *Escherichia coli* DE ORIGEN CANINO DE LA CIUDAD DE AMBATO”, como uno de los requisitos previos para la obtención del Título de grado de Médica Veterinaria Zootecnista, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

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

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

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Xiomara Sthefanny Garcés Arias', is written over a horizontal dotted line.

Xiomara Sthefanny Garcés Arias

C.I 160063408-1

AUTORA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación denominado "DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE GENES DE RESISTENCIA A BETALACTÁMICOS Y EVALUACIÓN DE DIVERSIDAD CLONAL EN AISLADOS DE *Escherichia coli* DE ORIGEN CANINO DE LA CIUDAD DE AMBATO", modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

APROBADO POR

FECHA


.....

30/01/2020

Ing. Mg. Giovanni Velástegui Espín

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN


.....

30-1-2020

Dra. Sandra Cruz, PhD

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN


.....

30-1-2020

Dr. Mg. Pedro Díaz

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

DEDICATORIA

A mis padres Patricio y Carmita por no soltar mi mano a pesar de los tropiezos y caídas.
Gracias por enseñarme con su ejemplo a ser fuerte sin olvidar mi esencia.

A Darlyn. ¡Persigue sus sueños mi pequeño!.

A Jamileth Anahí, la raíz de mi mundo.

Los amo con todo el corazón.

Xiomara Garcés Arias

AGRADECIMIENTO

A Dios, por haberme permitido culminar este sueño que empezó como una loca idea y ahora es toda una realidad. Él ha puesto a maravillosas personas en mi camino, siempre en el momento justo.

A mis padres, por nunca dejar de creer en mí, por los consejos y haladas de oreja, por todo su amor.

A mi hermano, por esa chispa de alegría en los momentos más oscuros.

A mis abuelos, Hilda, Rosalino y Elena por rezar por mi desde lejos, por esa motivación para seguir en pie todos los días.

A Mauricio, gracias por todo tu apoyo y motivación en este tiempo que hemos compartido juntos. Te quiero.

A los docentes de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia por los conocimientos impartidos en las aulas y fuera de ellas a lo largo de mi formación profesional.

A Vannesa, por escucharme y echarme una mano cuando más lo necesito; gracias por los buenos momentos.

Finalmente, y de una manera especial a mi tutor, Doctor William Calero Cáceres quien con paciencia y conocimientos supo guiar mis pasos durante la ejecución de este trabajo. Más que un tutor se convirtió en un amigo, un Dios le pague por todo.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR	¡Error! Marcador no definido.
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN ..	¡Error! Marcador no definido.
DERECHOS DE AUTOR	¡Error! Marcador no definido.
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO ...	¡Error! Marcador no definido.
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO I	1
MARCO TEÓRICO	1
1.2 Antecedentes investigativos	1
1.2 Objetivos	8
1.2.1 Objetivo general	8
1.2.2 Objetivos específicos	8
CAPÍTULO II	9
METODOLOGÍA	9
2.1 Materiales y equipos	9
2.2 Métodos	12
2.3 Manejo del experimento	14
2.3.1. Obtención de aislados de <i>E. coli</i> en caninos de la ciudad de Ambato .	14
2.3.3 Extracción de DNA (Choque térmico).....	14
2.3.4 Técnica de PCR.....	15
2.2.5 Preparación de soluciones	18
2.2.6 Electroforesis en gel de agarosa 1%.....	20
2.2.7 Electroforesis en gel de agarosa 1,5%	20
CAPÍTULO III	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
3.1 Resultados	22

Identificación de la presencia de genes <i>bla_{CTX-M}</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{SHV}</i> y <i>bla_{CMY}</i> de resistencia a betalactámicos en aislados de <i>E. coli</i>	22
Ensayos de conjugación	27
Evaluación la diversidad clonal de los genes de resistencia a betalactámicos en aislados de <i>E. coli</i>	28
Análisis jerárquico de los mecanismos de resistencia genotípica a β-lactámicos.	32
3.2 Discusión	36
CAPÍTULO IV	42
CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS	42
4.1 CONCLUSIONES	42
4.2 BIBLIOGRAFÍA	43
4.3 ANEXOS	54
4.3.1 ANEXO A	54
Fotografías.....	54
4.3.2 ANEXO B	55
Identificación de la presencia de genes <i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{CTX-M}</i> y <i>bla_{CMY}</i> de resistencia a betalactámicos en aislados de <i>E. coli</i>	55
4.3.3 ANEXO C	57
Ensayo con el marcador molecular (GTG) ₅ para la evaluación de la diversidad clonal de los genes de resistencia a betalactámicos en aislados de <i>E. coli</i>	57
4.3.4 ANEXO D	58
Detalle de los patrones fenotípicos y genotípicos de los aislados de <i>E. coli</i> provenientes de caninos de la ciudad de Ambato	58

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas control utilizadas en la amplificación de los genes de resistencia ...	15
Tabla 2. Primers usados en este estudio para la amplificación de genes.	16
Tabla 3. Protocolo para PCR multiplex	16
Tabla 4. Condiciones de reacción para PCR multiplex, por genes.	17
Tabla 5. Protocolo para (GTG) ₅ -PCR.....	18
Tabla 6. Condiciones de reacción para (GTG) ₅ -PCR.....	18
Tabla 7. Presencia de genes de resistencia a betalactámicos (<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} y <i>bla</i> _{CMY}) en muestras del banco de cepas BLEE.	23
Tabla 8. Combinaciones de genes de resistencia en muestras analizadas.....	25
Tabla 9. Porcentaje de presentación de genes de resistencia dependiendo del origen de la muestra.	25
Tabla 10. Características epidemiológicas de las 68 muestras aisladas en caninos de la ciudad de Ambato.....	26
Tabla 11. Resultados de la transconjugación entre cepa donadora y <i>E. coli</i> J53.....	27
Tabla 12. Detalle de cada aislado agrupado por conglomerados.	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Orden de colocación en los pocillos para PRC multiplex.	20
Figura 2. Orden de colocación en los pocillos para (GTG)5.	21
Figura 3. Presentación individual de cada gen.....	22
Figura 4. Dendograma de los 68 aislados de <i>E. coli</i> procedentes de caninos de Ambato.....	30
Figura 5. Árbol jerárquico de los resultados de la presencia de los cuatro genes de resistencia a betalactámicos de las 68 cepas analizadas, donde:.....	33
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa	55
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa	55
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa	56
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa	56
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa para la evaluación de la diversidad clonal. Marcador molecular (GTG)5.....	57

RESUMEN

La evolución y diseminación de bacterias con genotipos de resistencia a antibióticos de interés prioritario como los betalactámicos representa un problema de salud pública. Por lo tanto, la detección de reservorios, vías de diseminación y de evolución de estas bacterias es considerado de importancia para limitar sus efectos negativos en salud pública y animal. *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) constituye un problema de salud emergente. En Ecuador son pocos los datos disponibles sobre la epidemiología molecular de los de *E. coli* productora de BLEE. En el presente estudio, se evaluó la presencia de genes de resistencia a betalactámicos así como la diversidad clonal de aislados de *E. coli* de origen canino de la ciudad de Ambato. La mayor presencia de genes de resistencia a betalactámicos se dio en perros con dueño en contraste a perros callejeros, así como los genes detectados con mayor frecuencia fueron *bla*_{CTX-M} y *bla*_{TEM}. Los genes *bla*_{SHV} y *bla*_{CMY} presentaron una menor tasa de detección, sin embargo, éstos se encontraron en combinación con los genes *bla*_{CTX-M} y *bla*_{TEM}, denotando que se tratan de aislamientos con una considerable virulencia. En cuanto a la diversidad clonal, el análisis de los resultados del marcador de regiones repetitivas palindrómicas (GTG5) descartó que los aislados provengan de un clon multirresistente con un ancestro común reciente, sugiriendo una transmisión horizontal de genes de resistencia. Los perros pueden actuar como un reservorio silencioso de microorganismos con genotipos de multirresistencia a antibióticos, por lo que es necesaria una revisión de los procedimientos de gestión de residuos, así como las interacciones con humanos y animales bajo determinadas circunstancias.

Palabras clave: *Escherichia coli*, betalactamasas, BLEE, caninos, Ambato, zoonosis.

ABSTRACT

The evolution and spread of multiresistant bacteria is considered priority, considering their impact in public health and animal safety worldwide. Therefore, the detection of reservoirs, routes of dissemination and evolution of these bacteria is aimed in order to limit their negative effects on public and animal health. Extended-spectrum-beta-lactamase *Escherichia coli* producer is considered an emerging health problem. In Ecuador, there are few available data on the molecular epidemiology of those of ESBL- *E. coli* producing bacteria in animals and environment. In the present study, the presence of beta-lactam resistance genes was evaluated as well as the clonal diversity of *E. coli* isolates of canine origin from the city of Ambato. The highest presence of beta-lactam resistance genes occurred in dogs with owners, in contrast to stray dogs. The most frequently detected genes were *bla*_{CTX-M} and *bla*_{TEM}. The *bla*_{SHV} and *bla*_{CMY} genes had a lower detection rate, however, these were found in combination with the *bla*_{CTX-M} and *bla*_{TEM} genes, indicating that they are isolates with considerable virulence. The analysis of clonal relatedness through the amplification of palindromic repetitive regions (GTG5) detected that the isolates comes from different lineages, discarding the hypothesis that suggest the presence of multi-resistant clones with a common ancestor, suggesting that their genotypes were acquired through recent horizontal genetic transmission. Dogs can act as a silent reservoir of microorganisms with antibiotic multiresistance genotypes. It is necessary an extended review of waste management procedures is necessary, as well as interactions with humans and animals under certain circumstances like immunological disorders.

Keywords: *Escherichia coli*, betalactamases, ESBL, canines, Ambato, zoonoses.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.2 Antecedentes investigativos

La resistencia antimicrobiana a fármacos de uso común se ha convertido en un problema de preocupación mundial. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, a nivel mundial se han reportado una elevación en los niveles de resistencia a antibióticos de bacterias que se presentan comúnmente en infecciones sistémicas, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*, seguidas de *Salmonella spp* (**World Health Organization 2018**). Los perfiles de resistencia a antibióticos presentan una marcada variabilidad geográfica y temporal, observándose una mayor tasa de organismos multirresistentes en países en vías de desarrollo en contraste con los países desarrollados (**Pick and Azari 2008; WHO 2017**). La implementación o ausencia de políticas enfocadas en el control del uso de antimicrobianos en el sector clínico y animal influyen en estos porcentajes. Considerando la complejidad de la problemática, se recomienda aunar esfuerzos en investigación en todas las áreas implicadas en la emergencia de la resistencia antimicrobiana (salud humana, animal y ambiental) dentro de un enfoque denominado “One Health”, con la finalidad de minimizar el efecto de la generación y diseminación de nuevos clones resistentes, con potencial interés sanitario y epidemiológico (**Van Puyvelde, Deborggraeve, and Jacobs 2018**).

En la práctica clínica, tanto humana como veterinaria, los antibióticos betalactámicos juegan un papel primordial en el tratamiento de enfermedades de origen bacteriano. Características como ser un antibiótico de lenta acción bactericida dependiente del tiempo, diferentes grados de espectro de acción, su baja toxicidad y buena distribución lo hacen ideal para el manejo en primera instancia (**Pujol and Peña 2003; Suárez and Gudiol 2009**). Su mecanismo de acción bactericida se centra en la debilitación de la pared celular bacteriana al inhibir la transpeptidación (entrecruzamiento de peptidoglicano, responsable de la estabilidad de la pared), provocando la ruptura de la

misma durante la división celular, además activa el mecanismo autolítico endógeno bacteriano provocando la muerte celular (**Restrepo Salazar 2013**). El uso combinado de los betalactámicos con inhibidores de betalactamasas y varias modificaciones de la molécula original, que han resultado en una amplia gama de derivados mucho más potentes y con mayor espectro antimicrobiano, han logrado readquirir, en parte, su espectro de acción (**Miranda García 2013; Pujol and Peña 2003**).

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas que se caracterizan por conferir resistencia bacteriana a penicilinas y cefalosporinas, pudiendo ejercer su efecto en las de tercera y cuarta generación (**Malloy and Campos 2011**). Después de al menos una década de uso, se detectan las primeras betalactamasas producidas por *E. coli* que fueron TEM-1 y SHV-1; adicionalmente, se descubren las betalactamasas de tipo AmpC; en la década de los 90's se detecta la betalactamasa CTX-M-1. A medida que avanza la potencialización de antimicrobianos, los mecanismos de resistencia siguen fortaleciéndose, dando paso a bacterias multirresistentes (**Abarca and Herrera 2001; Gniadkowski 2001; Martínez 2016; Nagel 2000; Pujol and Peña 2003**).

El desarrollo de los mecanismos de resistencia a betalactámicos se da por mutaciones en la información genética de la bacteria y pueden ser clasificados en dos grupos: cromosómicos, cuando la mutación se da en los genes que controlan las estructuras o funciones sobre las cuales actúa el antimicrobiano, disminuyendo su efecto sobre la estructura blanco y heredando estas modificaciones a sus descendientes en una o varias generaciones (transferencia vertical); y extracromosómico, cuando la adquisición del material genético se da por segmentos no pertenecientes al cromosoma bacteriano como plásmidos o trasposones, y pasan de una bacteria a otra dentro de una misma generación (transferencia horizontal). De este modo, algunos de los mecanismos de resistencia a los betalactámicos son producción de enzimas (betalactamasas) como la penicilinasasa, cefalosporinasasa, etc., que se unen a la molécula del betalactámico y forman un compuesto inestable que se descompone rápidamente sin ejercer ningún efecto a la bacteria; la disminución de la permeabilidad del antibiótico por la

modificación genética en la estructura de las porinas; la hiperproducción de betalactamasas que, con un mecanismo de inhibición competitiva satura y neutraliza al betalactámico, anulando totalmente su función; la modificación de las proteínas PBP's, incapacitando la unión del antibiótico, y la resistencia por tolerancia, causando que las bacterias pierdan autolisinas y toleren la CIM del antibiótico (**Abarca and Herrera 2001; Finch et al. 2010; Medina Morales, Machado Duque, and Machado Alba 2015; Miranda García 2013; Oliver and Cantón 1990; Pantozzi et al. 2010; Pujol and Peña 2003; Sánchez et al. 2015; Suárez and Gudíol 2009**).

Ante la emergencia de la resistencia antimicrobiana, la OMS ha diseñado un plan de acción a nivel mundial, focalizado en la concientización del uso indiscriminado de antibióticos, el cruce y recopilación de datos a nivel local, nacional y mundial (**OMS 2019**). En países latinoamericanos como El Salvador, Uruguay, Chile, Argentina y Perú ya se ejecutan lineamientos técnicos para la prevención, vigilancia y contención de resistencia a antimicrobianos. Ecuador no ha sido la excepción, en julio de 2019, la ministra de salud, mediante memorando, dispuso la aplicación del “Plan Nacional para la prevención y control de la resistencia antimicrobiana” en todo el territorio, el cual consta del sistema WHONET que reúne la información de la red de 44 centros de servicio médico en el país. El INSPI es la entidad encargada del funcionamiento de este sistema (**INSPI 2016; Ministerio de Salud Pública del Ecuador 2019; Villacís 2017**). Lamentablemente, Ecuador no cuenta con un registro del uso de antimicrobianos ni con una base de datos que indique la prevalencia de los distintos tipos de resistencias, por lo que las autoridades exhortan a la colaboración de los profesionales de la salud (**Gestal and Villacís 2014**).

Las β -lactamasas de tipo *bla*_{CTX-M} son enzimas producidas por genes que confieren resistencia a las cefalosporinas, con mayor eficacia contra cefuroxima, cefotaxima y cefepima con poca acción frente a ceftazidima y cefepime; se pueden transferir de forma horizontal por medio de plásmidos, trasposones, integrones y segmentos del cromosoma (**Gniadkowski 2001; López-Velandia, Torres-Caycedo, and Prada-Quiroga 2015; Pagani et al. 2003; Saunders et al. 2017**). Las BLEE de tipo *bla*_{TEM}

son activas frente a ampicilina, penicilina y cefalosporinas de primera generación; en varios países este es uno de los tipos de BLEE dominante y sus polimorfismos llegan hasta TEM 167 (López-Velandia et al. 2015; Yañez Muñoz 2011). Las BLEE de tipo *bla_{SHV}* confieren resistencia a las penicilinas y cefalosporinas de primera generación (Hordijk et al. 2013; Sidjabat et al. 2007). Finalmente, la importancia clínica de las BLEE de tipo *bla_{CMY}* radica en la adjudicación de resistencia a betalactámicos como penicilinas, cefalosporinas de tercera generación como cefotaxima, ceftazidima y ceftriazona, cefalosporinas de cuarta generación como cefepina, carboxipenicilinas y acilureido-penicilinas (Ayala et al. 2016).

El beneficio afectivo y emocional de la tenencia de mascotas en el ser humano ha sido ampliamente documentado (Ayasta Salazar 2017; De Gomar 2018; Nägele 2019). Esta relación favorece el desarrollo social, la salud mental y potencia el desenvolvimiento de la persona en el entorno (Saunders et al. 2017). Sin embargo, la microbiota de estos animales puede representar un reservorio de bacterias zoonóticas resistentes a antimicrobianos que afectan gravemente al ser humano, incluyendo *E. coli* (Carvalho et al. 2016; Li et al. 2017). Un estudio realizado en Brasil, reveló que de las 134 relaciones persona-perro en estrecho contacto, el 9,5% comparte bacterias con patrones de resistencia muy similares, mostrando que los perros domésticos pueden influenciar la microbiota humana, incluyendo microorganismos resistentes (Carvalho et al. 2016).

En Quito, Ecuador, se estudió la presencia de bacterias productoras de BLEE's y AmpC en caninos del casco urbano de la ciudad. De las 270 muestras tomadas al azar, el 32,97% fueron positivas a *E. coli*. De este porcentaje el 87,64% fue positivo a BLEE's y en 12,35% correspondió a AmpC (Espinosa Alberca 2017).

Un estudio realizado en China, recuperó muestras procedentes de caninos domésticos. De los 240 aislamientos obtenidos en el periodo 2007-2008, el 40,4% (97 muestras) fueron productoras de BLEE y de este porcentaje, el 40,0% (96 muestras) fueron de tipo CTX-M. De estos, los subtipos que se hallaron con mayor frecuencia fueron CTX-

M-14 (n=45) y CTX-M-55 (n=24); se dio un nuevo reporte de CTX-M-64, con un número de 3 muestras. Adicionalmente se identificaron CTX-M de tipo -27, -15,-65,-24,-3 y -9. La combinación de varios tipos de CTX-M se identifica en 10 aislamientos, siendo CTX-M-14 Y CTX-M-55 las más frecuentes (**Sun et al. 2010**).

En Túnez, África, se aislaron muestras fecales de caninos clínicamente sanos para obtener *E. coli* resistente a cefotaxima (CTX). De los 14 positivos se detectaron genes BLEE de tipo *bla*_{CTX-M-1} (n=8) y asociaciones entre *bla*_{CTX-M-1} + *bla*_{TEM-1b} (n=3); *bla*_{CTX-M-1} + *bla*_{TEM-1c} (n=1); *bla*_{CTX-M-1} + *bla*_{TEM-135} (n=1) y *bla*_{CMY-2} + *bla*_{TEM-1b} (n=1). Además, se detectó en una cepa del grupo genético CTX-M-1, el gen de resistencia a quinolonas *qnr*_{B19}. Ambos tipos de genes son de importancia clínica tanto humanos como animales de compañía ya que su estudio revela fuentes de transmisión zoonótica (**Sallem et al. 2013**).

En Japón se estudió la transmisión de *E. coli* productora de BLEE de tipo CTX-M en perros y gatos domésticos enfermos. De los 178 aislamientos se detectó un 23,6% (n=42) en perros y 7,3% (n=13) en gatos de positivos a *E. coli* productora de BLEE. De estos los tipos predominantes fueron CTX-M-14 (26.8%), CTX-M-15 (24.4%), CTX-M-27 (19.5%) y CTX-M-55 (19.5%). Cierta similitud hallada en características como serotipo, genotipo, grupo filogenético de los aislados de los perros y gatos estudiados con los de personas previamente reportados sugiere una probable transmisión de bacterias resistentes entre humanos y animales infectados (**Kawamura et al. 2017**).

En Utrecht, Holanda, se estudió la prevalencia de *E. coli* productora de BLEE y AmpC en perros y gatos clínicamente sanos y diarreicos mediante la técnica de PCR y análisis de secuenciación. Los resultados indicaron una prevalencia de *E. coli* con reducida susceptibilidad a cefotaxima, entre 45 y 55% en perros sanos y diarreicos respectivamente; y entre 0 y 25% en gatos sanos y diarreicos respectivamente. Se identificaron genes de tipo BLEE y AmpC, principalmente *bla*_{CTX-M-1}, además *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-52}, *bla*_{SHV-12} y *bla*_{CMY-2}. Se concluye que la prevalencia de *E.*

coli productora de BLEE y AmpC es relativamente alta en perros y gatos (**Hordijk et al. 2013**).

Entre los años 2002 a 2004 en La Habana, Cuba, se aislaron 31 muestras positivas a fenotipos BLEE de 326 cepas recolectadas. Los ensayos de PCR detectaron la presencia de genes de tipo *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV}; de las 31 muestras aisladas, el 61% (n=19) portaban el gen *bla*_{TEM}, el 5% (n=5) portaban el gen *bla*_{SHV}, el 12% (n=4) fueron portadoras de ambos genes y el 35% (n=11) no presentaron ninguno de los genes evaluados. En cuanto al análisis de sensibilidad se evaluó un panel de siete antimicrobianos y el reporte de porcentaje de resistencia fue el siguiente: Amoxicilina/ácido clavulánico (90,32%), Cefepime (77,41%), Ciprofloxacina (35,48%), Gentamicina (41,93%), Imipenem (0%), Meropenem (0%) y Tobramicina (87,07%) (**González Mesa et al. 2007**).

El impacto de la presencia de bacterias resistentes no solo afecta a la calidad de vida del ser humano, sino también a animales de compañía. En Lisboa, se analizaron muestras obtenidas a partir de perros y gatos diagnosticados con infección del tracto urinario, siendo *E. coli* el patógeno mayormente asociado a la infección. De las 303 muestras, el 46,2% fue resistente al menos a uno de los antibióticos del panel evaluado (ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, cefotxitina y cefalosporinas de tercera generación); 32,3% fueron resistentes a la ampicilina sola. En cuanto a la evaluación genética, las cepas que fueron resistentes a la ampicilina presentaron presencia de genes *bla*_{TEM} en un 72,4%, *bla*_{SHV} en 13,3% y *bla*_{OXA-1} en 6,1%; 3,1% presentaron simultáneamente genes de tipo *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV} y el 11, 2% no presentó ningún tipo de genes de resistencia (**Da Silva Franco 2017**).

En Turquía, se analizaron 428 muestras fecales de perros clínicamente sanos, de las cuales el 22,2% (n=95) fueron resistentes a la cefotaxima; en cuanto al análisis de genes tipo BLEE se hallaron *bla*_{CTXM-1} (n=15), *bla*_{CTXM-3} (n=16) *bla*_{CTXM-15} (n=62), *bla*_{TEM-1b} (n=42), *bla*_{CMY-2} (n=22), *bla*_{OXA-1} (n=9) y *bla*_{SHV-12} (n=3), bien solos o combinados (**Aslantas and Yilmaz 2017**).

La investigación realizada en animales de compañía y caballos describe el hallazgo de distintos tipos de enterobacterias productoras de BLEE. Con un número de 65 aislamientos obtenidos de perros (n=38), gatos (n=14), caballos (n=12) y una tortuga (n=1) se observaron distintos tipos de genes de resistencia de tipo BLEE y AmpC, los cuales fueron *bla*_{CTXM-1} (predominante: n=17), *bla*_{CTXM-2}, *bla*_{CTXM-9} (en combinación con genes de tipo *qnr*_{A1}), *bla*_{CTXM-14}, *bla*_{CTXM-15}, *bla*_{TEM-52}, *bla*_{CMY-2} y *bla*_{CMY-39}. En cuanto a los perfiles de resistencia a antimicrobianos 55 aislamientos fueron resistentes a cefotaxima y ceftazidima (**Dierikx et al. 2012**).

La identificación de la diversidad bacteriana utilizando regiones conservadas es de considerable importancia en epidemiología molecular, ya que permiten estimar la filogenia entre aislamientos. A nivel experimental, se han desarrollado varias técnicas como PFGE, ERIC-PCR, ERIC-2-PCR, BOX-PCR y (GTG)₅-PCR para su estimación (De Vuyst et al. 2008). Entre estas técnicas, (GTG)₅ presenta un desempeño muy aceptable en la asignación filogenética entre bacterias. Este procedimiento se basa en la amplificación de secuencias entre las zonas repetitivas de un genoma, usando el cebador (primer) (GTG)₅, que no solo diferencia entre especie o subespecie de una bacteria, potencialmente podría diferenciar hasta el nivel de cepas bacterianas (Braem et al. 2011). La técnica genotípica (GTG)₅ es rápida y reproducible, además de su bajo costo en relación a las otras. Varias investigaciones concluyen que esta técnica es una herramienta útil para una tipificación y especiación rápida y confiable (**Gevers, Huys, and Swings 2001; González-De La Cruz et al. 2011; Mohapatra, Broersma, and Mazumder 2007**).

El propósito de esta investigación se centra en evaluar la presencia y diversidad clonal de cepas de *E. coli* portadoras de cuatro genes de resistencia a betalactámicos en aislados provenientes de caninos domésticos y callejeros de la ciudad de Ambato, durante el 2018.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

- Determinar la presencia de genes de resistencia a betalactámicos y evaluar la diversidad clonal de aislados de *E. coli* de origen canino de la ciudad de Ambato.

1.2.2 Objetivos específicos

- Identificar la presencia de genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} y *bla*_{CMY} de resistencia a betalactámicos en aislados de *E. coli* por medio de la técnica de PCR multiplex.
- Evaluar la diversidad clonal de los genes de resistencia a betalactámicos en aislados de *E. coli* por medio de PCR.
- Determinar la clonalidad entre los aislados de *E. coli* a través del análisis de dendogramas.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Materiales y equipos

Equipos de laboratorio

Detalle	Cantidad
Autoclave M11 Ultra Clave MIDMARK	1
Balanza analítica Cap. 150 g (1g)	1
Estufa bacteriológica +5°C - 120°C	1
Termociclador Life Technologies Simply Anip	1
Transiluminador UV enduro TM GDS Tovver	1
Cámara de <i>Electroforesis OWL Easycast</i> Thermo Scientific	1
Incubador Bacteriológico	1
Mechero Bunsen	1
Nevera (4° C)	1
Congelador (-20°C)	1
Cabina de Flujo Laminar Bioseguridad 2	1
Microcentrífuga Sorvall Legend Micro i7	1
Micropipeta 1000 µL	1
Micropipeta 200 µL	2
Micropipeta 100 µL	1

Instrumentos de laboratorio

Detalle	Cantidad
Espátula	1
Asa de Inoculación	2
Cajas mono Petri plásticas	100
Pipetas estériles de plástico de 10 ml	50
Mechero de Alcohol	1

Detalle	Cantidad
Puntas de micropipeta de 10, 200 y 1000 μ L	100 de c/u
Gradillas	5
Tubos Eppendorff	1000
Tubos de Ensayo con Tapa	40
Botellas de tapa azul de 1000 mL	2
Botellas de tapa azul de 500 mL	5
Botellas de tapa azul de 100 mL	2

Reactivos de laboratorio

Detalle	Cantidad
Agar McConkey	500 gr
Caldo LB (Luria Bertani)	500 gr
Agua Mili-Q	5 litros
Agua destilada	10 litros
Ceftriaxona	50 gramos
Azida de sodio	50 gramos

Materiales para PCR

Detalle	Cantidad
Tubos 0.2 μ L para PCR	500
Puntas de micropipetas 200 μ L (estériles)	300
Puntas de micropipetas 10 μ L (estériles)	300
Gradilla para tubos de PCR	2
Botella de vidrio para desechos	2
Cooler-nevera (-20 °C) para tubos Eppendorf (Cooleman)	

Reactivos para PCR

Detalle	Cantidad
Phusion master mix	2 unidades
Agua libre de nucleasas	2 unidades
Cebador (primer) gen <i>bla</i> _{TEM}	1 unidad
Cebador (primer) gen <i>bla</i> _{CTX-M}	1 unidad
Cebador (primer) gen <i>bla</i> _{CMY}	1 unidad
Cebador (primer) gen <i>bla</i> _{SHV}	1 unidad
Ultrapure™ 10X TBE buffer 1L invitrogen	1 unidad
Marcador de peso molecular (Ladder 100 pb)	1 unidad
Marcador de peso molecular (Ladder 1000 pb)	1 unidad
Agente revelante: Sybr® Safe DNA Gel Stain	1 unidad

Insumos de laboratorio

Detalle	Cantidad
Termo de Transporte 10 L	1
Mascarillas	1 caja
Guantes de Examinación (Nitrilo)	3 cajas
Cinta Testigo de Esterilización	1 rollo
Cinta Adhesiva Auca de Papel	2 rollos
Papel Aluminio	3 rollos
Papel Kraft	1 rollo
Hilo Chillo	1 bobina
Alcohol industrial	2 litros
Alcohol Antiséptico	1 litro
Gel Antibacterial	1 frasco
Jabón Líquido	1 frasco
Cloro	1 galón

Materiales de escritorio

Detalle	Cantidad
Computadora	1
Cámara Fotográfica	1
Hojas de Papel Bond A4	1 paquete
Impresora	1
Cuaderno de laboratorio	1
Marcador para CD	1
Esferos	5 unidades

2.2 Métodos

2.2.1 Localización del área de estudio

La presente investigación forma parte de la segunda etapa de la investigación sobre la presencia de genes de resistencia a antibióticos emergentes *E. coli* de origen canino en la ciudad de Ambato, desarrollada durante los meses de Diciembre 2017– Junio de 2018.

Las muestras de análisis fueron tomadas en 2 diferentes clínicas veterinarias, pertenecientes a la ciudad de Ambato, provincia de Tungurahua (nombres no revelados por concepto de confidencialidad); además en 3 diferentes albergues de animales callejeros de la misma ciudad, y en el Hospital Veterinario de la Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias Agropecuarias.

En el presente estudio, las muestras denominadas como “Domésticas” hacen referencia a las tomadas de clínicas veterinarias (CVSP Y CVPP), mientras que las denominadas “Callejeras” hacen referencia a las obtenidas de albergues de perros callejeros y del HDV-UTA (Callejero y callejero HDV).

2.2.2 Ubicación del laboratorio

Esta investigación se llevó a cabo en el laboratorio del grupo de investigación UTA-RAM-OneHealth, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, misma que se encuentra localizada en el cantón Cevallos, sector Querochaca.

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

2.2.3 Características del lugar

La investigación se llevó a cabo en los laboratorios de investigación de Microbiología Ambiental y Agrícola, microbiología veterinaria y biología molecular pertenecientes a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.

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

2.2.4 Factores en estudio

- Genes de resistencia antimicrobiana: *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CMY}.
- Gen para ensayo de fingerprinting: (GTG)₅
- Banco de microorganismos del Laboratorio de Microbiología Ambiental y Agrícola: cepas bacterianas de *E. coli* positivas a BLEE y AmpC.

2.2.5 Tratamientos

Al ser un estudio netamente descriptivo no existen tratamientos de ningún tipo. El estudio evalúa la presencia de genes de resistencia (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CMY}) a antibióticos en un banco de cepas aisladas a partir de muestras tomadas de caninos callejeros y domésticos de la ciudad de Ambato.

2.2.6 Diseño experimental

La investigación emplea un diseño de tipo observacional-descriptivo pues estudia un grupo de cepas con características de interés, sin manipulación de las variables; además fue retrospectiva-transversal, pues parte de un banco de cepas clasificadas como BLEE y AmpC de *E. coli*; se realizó un dendograma de relación jerárquica entre los fenotipos detectados.

2.3 Manejo del experimento

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

Las cepas utilizadas en la investigación fueron obtenidas a partir de hisopados rectales de perros provenientes de clínicas veterinarias y refugios de perros callejeros. De las 148 muestras analizadas, se confirmaron 68 como aislados productores de BLEE después de realizarse las pruebas bioquímicas de confirmación e identificación.

2.3.2 Extracción de DNA (Choque térmico)

La extracción de DNA bacteriano se realizó a partir de las cepas criopreservadas bajo el siguiente protocolo:

- Tomar 20 µL de la bacteria criopreservada e inocular en 5 ml de caldo LB contenido en un tubo de ensayo e incubar a 37 °C *over night*.

- Tomar 1000 μ L de la biomasa generada y colocar en un tubo Eppendorf rotulado y llevar a centrifugación durante 10 minutos a 9000 rpm.
- Retirar el sobrenadante sin tomar contacto con el pellet del fondo, colocar 500 μ L de agua Mili-Q y mezclar vigorosamente dando un vórtex durante 15 segundos.
- Llevar a baño maría durante 15 minutos a 90 °C y luego a la nevera a -4 °C durante 10 minutos.
- Centrifugar durante 5 minutos a 5000 rpm.
- Retirar el sobrenadante, cuidando de no tener contacto con el pellet y colocarlo en un tubo Eppendorf rotulado.
- Desechar el pellet y almacenar el sobrenadante a -4 °C (**González-De La Cruz et al. 2011; Hernández et al. 2009**).

2.3.3 Técnica de PCR

Para la realización de esta técnica se dispuso de cuatro controles positivos, que son cepas de bacterias portadoras de los genes en estudio, detallados en la tabla 1 y cebadores o primers detallados en la tabla 2.

Tabla 1. Cepas control utilizadas en la amplificación de los genes de resistencia

GEN (Control positivo)	Origen de la bacteria
<i>bla_{CTX-M}</i>	<i>Escherichia coli</i> DH5 α + pGEM (<i>bla_{CTX-M}</i>) Universidad de Barcelona-MARS
<i>bla_{TEM}</i>	<i>Escherichia coli</i> DH5 α + pGEM (<i>bla_{TEM}</i>) Universidad de Barcelona-MARS
<i>bla_{SHV}</i>	<i>Escherichia coli</i> DH5 α + pGEM (<i>bla_{SHV}</i>) Universidad de Barcelona-MARS
<i>bla_{CMY}</i>	<i>Escherichia coli</i> DH5 α + pGEM (<i>bla_{CMY}</i>) Universidad de Barcelona-MARS

Fuente: (Autor, 2019)

Tabla 2. Primers usados en este estudio para la amplificación de genes.

GEN	PRIMER	SECUENCIA	TAMAÑO	REFERENCIA
<i>bla_{CTX-M}</i>	CTXM-F	ATG TGC AGY ACC AGT AAR GT	600 pb	(Pagani et al. 2003)
	CTXM-R	TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA		
<i>bla_{TEM}</i>	TEM-F	CTC ACC CAG AAA CGC TGG TG	569 pb	(Colomer-Lluch, Imamovic, et al. 2011)
	TEM-R	ATC CGC CTC CAT CCA GTC TA		
<i>bla_{SHV}</i>	SHV-F	TTA TCT CCC TGTTAG CCA CC	796 pb	(Dierikx et al. 2012)
	SHV-R	GAT TTG CTG ATT TCG CTC GG		
<i>bla_{CMY}</i>	CMY-F	ATG ATG AAA AAA TCG TTA TGC TGC	1138 pb	(Dierikx et al. 2012)
	CMY-R	GCT TTT CAA GAA TGC GCC AGG		

Fuente: Autor (2019)

La amplificación de los genes *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* y *bla_{CMY}* se realiza mediante la técnica de PCR multiplex, con un volumen final de 11,25 µL siguiendo el protocolo descrito en la tabla 3.

Tabla 3. Protocolo para PCR multiplex

Reactivo	Cantidad (µL)	Descripción
		Phusion U Hot Start DNA
2x Phusion U Green Multiplex PCR Master Mix	6,25	Polymerase, 2X reaction buffer, 3 mM MgCl ₂ , 400 µM of each dATP, dTTP, dCTP and dGTP.
Primer-F	0,25	Concentración: 10 µM
Primer-R	0,25	Concentración: 10 µM
dd H ₂ O	4,5	Agua libre de nucleasas
DNA	1,25	DNA bacteriano

Fuente: Autor (2019)

Las condiciones para el desarrollo de la reacción de PCR de cada gen se detallan en la tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de reacción para PCR multiplex, por genes.

PCR	CICLOS	REACCIÓN
<i>bla</i> _{CTX-M}	30	
<i>bla</i> _{SHV}	30	
<i>bla</i> _{TEM}	30	
<i>bla</i> _{CMY}	30	

Fuente: (Autor, 2019)

Para los ensayos de (GTG)₅ fingerprinting se siguió el protocolo detallado en la tabla 5, usando el primer (GTG)₅. Las condiciones para el desarrollo de la reacción de (GTG)₅-PCR se detallan en la tabla 6.

La secuencia del gen (GTG)₅ para ensayo de fingerprinting es la siguiente

→ 5'-GTG-GTG-GTG-GTG-GTG-3'

Tabla 5. Protocolo para (GTG)5-PCR

Reactivo	Cantidad (μL)	Descripción
2x Phusion U Green Multiplex PCR Master Mix	12,5	Phusion U Hot Start DNA Polymerase, 2X reaction buffer, 3 mM MgCl ₂ , 400 μM of each dATP, dTTP, dCTP and dGTP.
Primer-(GTG)5	0,25	Concentración: 30 μL
dd H ₂ O	11	Agua libre de nucleasas
DNA	1,25	DNA bacteriano procedente de choque térmico

Fuente: Autor (2019)**Tabla 6.** Condiciones de reacción para (GTG)5-PCR.

PCR	CICLOS	REACCIÓN
(GTG)5	30	

Fuente: (Autor, 2019)

2.2.4 Preparación de soluciones

Preparación de TBE 1x

- Medir 900 ml de agua destilada estéril.
- Tomar 100 ml de TBE 10X y mezclar.

Preparación de TBE 0,5x

- Medir 950 ml de agua destilada estéril.
- Tomar 50 ml de TBE 10X y mezclar.

Preparación del gel de agarosa al 1% para PCR multiplex

- Medir 70 ml de TBE 1X.
- Pesar 0,7 g de Agarosa.
- Mezclar y fundir en el microondas aproximadamente 90 segundos.
- Agregar 0,3 μ L de *SYBR® Safe DNA Gel Stain* cuando haya alcanzado los 40 °C y agitar cuidadosamente.
- Dispensar cuidadosamente en la bandeja de la cámara de electroforesis (previamente sellada en sus bordes y con los peines en su posición), evitando la formación de burbujas.
- Esperar al menos 15 minutos hasta su completa polimerización.

Preparación del gel de agarosa 2% para (GTG)5-PCR

- Medir 70 ml de TBE 1X.
- Pesar 1,4 g de Agarosa.
- Mezclar y fundir en el microondas aproximadamente 120 segundos.
- Agregar 0,5 μ L de *SYBR® Safe DNA Gel Stain 1 kb* cuando haya alcanzado los 40 °C y agitar cuidadosamente.
- Dispensar cuidadosamente en la bandeja de la cámara de electroforesis (previamente sellada en sus bordes y con los peines en su posición), evitando la formación de burbujas.
- Esperar al menos 15 minutos hasta su completa polimerización.

Preparación de agar MacConkey

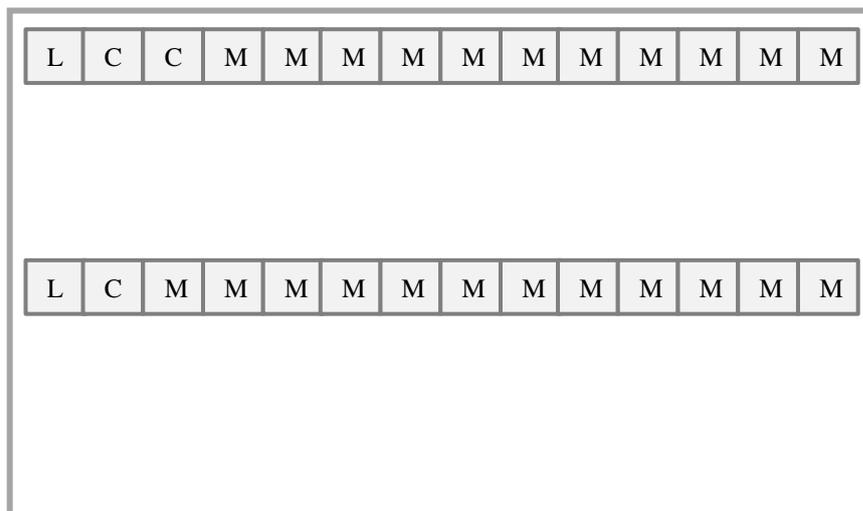
- Medir 50 g por cada 1000 ml de agua destilada.
- Homogeneizar la mezcla y autoclavar.

- Si fuere necesario agregar antibióticos, hacerlo cuando el agar haya alcanzado los 25 °C.
- Dispensar en cajas Petri y guardar.

2.2.6 Electroforesis en gel de agarosa 1%

- Colocar la bandeja en la cámara de electroforesis, previamente llena con solución de TBE al 1% y quitar los peines.
- Colocar las muestras en los pocillos en el orden descrito en la figura 1, donde L: Ladder, C: controles (+) o (-), M: muestras.
- Cerrar la cámara y programar a 120 voltios, durante 40 minutos.

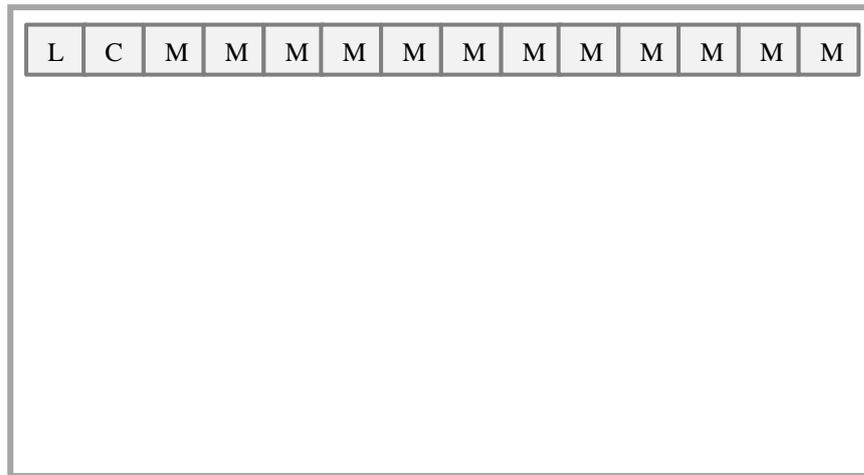
Figura 1. Orden de colocación en los pocillos para PRC multiplex.



2.2.7 Electroforesis en gel de agarosa 1,5%

- Colocar la bandeja en la cámara de electroforesis, previamente llena con solución de TBE al 0,5% y quitar los peines.
- Colocar las muestras en los pocillos en el orden descrito en la figura 2, donde L: Ladder, C: control (-), M: muestras.
- Cerrar la cámara y programar a 70 voltios, durante 5 horas.

Figura 2. Orden de colocación en los pocillos para (GTG)⁵.



Visualización de geles

- Retirar el gel de la cámara de electroforesis.
- Llevar al transiluminador UV y colocar en la bandeja.
- Programar y encender la luz UV y observar los fragmentos de DNA
(Colomer-Lluch, Jofre, and Muniesa 2011).

CAPÍTULO III

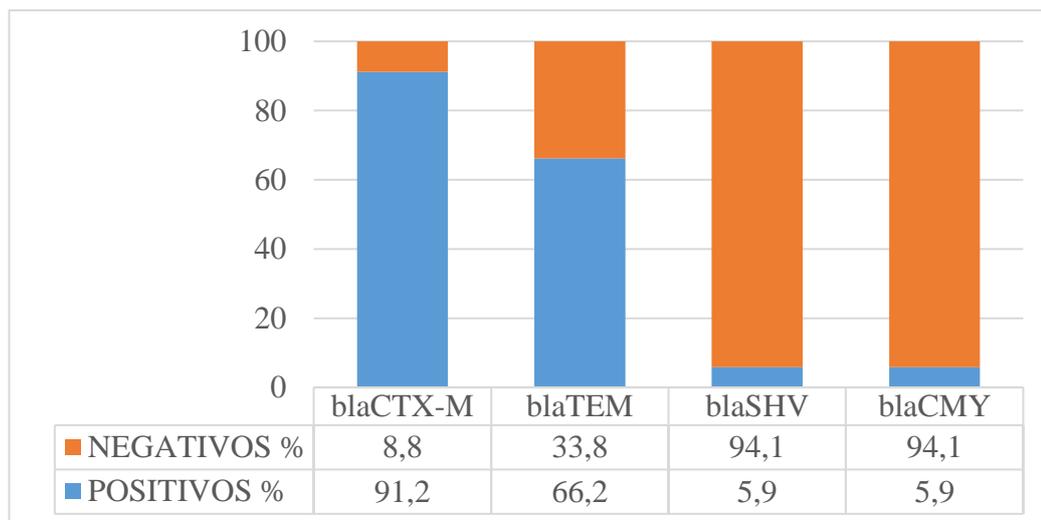
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Resultados

Identificación de la presencia de genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CMY} de resistencia a betalactámicos en aislados de *E. coli*.

La tabla 8 muestra los resultados de la detección de los cuatro genes de resistencia: *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CMY} en las muestras analizadas por la técnica de PCR multiplex. Se detectó una importante presencia de genes de resistencia en las clínicas veterinarias y en animales callejeros, siendo *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} los de mayor frecuencia de presentación, seguidos de *bla*_{SHV} y *bla*_{CMY}.

Figura 3. Presentación individual de cada gen.



Fuente: (Autor, 2019)

El Figura 3 muestra en detalle que el gen *bla*_{CTX-M} se encuentra presente en el 91,18% (n=62) de las muestras analizadas mientras que solo el 8,82% (n=6) son negativos; el gen *bla*_{TEM}, se halla en el 66,18% (n=45) de las muestras, frente al 33,82% (n=45) que son negativos; los resultados para los genes *bla*_{SHV} y *bla*_{CMY} son similares ya que se encontraron tan solo en el 5,88% (n=4) de las muestras mientras que el 94,12% (n=64) son negativas.

Tabla 7. Presencia de genes de resistencia a betalactámicos (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CMY}) en muestras del banco de cepas BLEE.

#	MUESTRA	ORIGEN	BLEE	AMPC	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{CTXM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CMY}
37	C18a	Callejero	SI	SI	-	+	-	-
61	C19b	Callejero	SI	SI	-	+	-	-
63	C17b	Callejero	SI	SI	-	+	-	-
62	C29b	Callejero	SI	SI	-	+	-	-
58	C2c	Callejero	SI	SI	-	+	-	-
61	C19b	Callejero	SI	SI	-	+	-	-
58	C2c	Callejero	SI	SI	-	+	-	-
74	C2b	Callejero	SI	SI	-	+	-	-
64	C30b	Callejero	SI	SI	-	+	-	-
77	C14b	Callejero	SI	SI	+	+	-	-
11	C14a	Callejero	SI	SI	+	+	-	-
10	C2a	Callejero	SI	SI	+	+	-	-
25	C19a	Callejero	SI	SI	+	+	-	-
20	C17a	Callejero	SI	SI	+	+	-	-
28	C30a	Callejero	SI	SI	+	+	-	-
69	C18b	Callejero	SI	SI	+	+	-	-
27	C29a	Callejero	SI	SI	+	+	-	-
65	C36	Callejero HDV	NO	SI	+	-	-	+
66	C37	Callejero HDV	SI	SI	-	-	-	+
66	C37	Callejero HDV	SI	SI	-	-	-	+
45	CVPP 08	CVPP	NO	SI	-	+	-	-
41	CVPP 04a	CVPP	NO	SI	-	+	-	-
44	CVPP 07a1	CVPP	SI	SI	-	+	-	-
43	CVPP 06	CVPP	SI	SI	+	+	-	-
42	CVPP 05a	CVPP	SI	NO	+	+	-	-
40	CVPP 03a	CVPP	NO	SI	+	+	-	-
55	CVPP 12a	CVPP	SI	SI	+	+	-	-
32	CVSP 68a	CVSP	SI	NO	+	-	+	-
71	CVSP 68b	CVSP	SI	SI	+	-	+	-
51	CVSP 89	CVSP	SI	NO	-	-	-	-
5	CVSP 12a	CVSP	SI	SI	+	+	+	-
78	CVSP47E2	CVSP	SI	SI	+	+	+	-
70	CVSP 73b	CVSP	SI	SI	-	+	-	-

#	MUESTRA	ORIGEN	BLEE	AMPC	bla _{TEM}	bla _{CTXM}	bla _{SHV}	bla _{CMY}
59	CVSP 99	CVSP	SI	SI	-	+	-	-
38	CVSP 79a	CVSP	SI	SI	-	+	-	-
76	CVSP 45E2	CVSP	SI	SI	-	+	-	-
8	CVSP 18Ea	CVSP	SI	SI	-	+	-	-
35	CVSP 76a	CVSP	SI	SI	-	+	-	-
46	CVSP 81a	CVSP	SI	SI	-	+	-	-
34	CVSP 73a	CVSP	SI	SI	-	+	-	-
56	CVSP 100a	CVSP	NO	SI	+	+	-	-
6	CVSP 15Sa	CVSP	SI	SI	+	+	-	-
9	CVSP 26Sa	CVSP	SI	SI	+	+	-	-
4	CVSP 08a	CVSP	NO	SI	+	+	-	-
31	CVSP 62a	CVSP	SI	NO	+	+	-	-
73	CVSP 62b	CVSP	SI	SI	+	+	-	-
57	CVSP 17Sb	CVSP	NO	SI	+	+	-	-
53	CVSP 94	CVSP	SI	SI	+	+	-	-
50	CVSP 85	CVSP	SI	SI	+	+	-	-
49	CVSP 84	CVSP	SI	NO	+	+	-	-
72	CVSP 57b	CVSP	SI	SI	+	+	-	-
60	CVSP 60b	CVSP	SI	SI	+	+	-	-
60	CVSP 60b	CVSP	SI	SI	+	+	-	-
16	CVSP 43S1	CVSP	SI	SI	+	+	-	-
15	CVSP 39S	CVSP	SI	SI	+	+	-	-
17	CVSP 45E1a	CVSP	NO	SI	+	+	-	-
14	CVSP 37E1	CVSP	SI	SI	+	+	-	-
19	CVSP 48E1	CVSP	NO	SI	+	+	-	-
13	CVSP 35E1	CVSP	SI	SI	+	+	-	-
19	CVSP 48E1	CVSP	NO	SI	+	+	-	-
18	CVSP 47E1	CVSP	SI	SI	+	+	-	-
47	CVSP 83a	CVSP	NO	SI	+	+	-	-
7	CVSP 17Sa	CVSP	SI	SI	+	+	-	-
36	CVSP 77a	CVSP	SI	SI	+	+	-	-
75	CVSP45E1	CVSP	SI	SI	+	+	-	-
30	CVSP 61a	CVSP	SI	SI	+	+	-	-
2	CVSP 04a	CVSP	NO	SI	+	+	-	-
52	CVSP 93	CVSP	SI	SI	+	+	-	+

Los perfiles genotípicos de resistencia identificaron que existen cinco tipos de combinaciones de los genes en estudio (detallados en la tabla 8), mientras que dos grupos indicaron la presentación de un solo gen y tan solo una muestra no presentó amplificaciones de ninguno de los cuatro genes analizados.

Tabla 8. Combinaciones de genes de resistencia en muestras analizadas.

N°	Genes combinados	Cantidad	%
C1	<i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{SHV}	2	2,9
C2	<i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{CMY}	1	1,5
C3	<i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{TEM}	39	57,4
C4	<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{SHV}	2	2,9
C5	<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{CMY}	1	1,5
S1	<i>bla</i> _{CTX-M}	20	29,4
S2	<i>bla</i> _{CMY}	2	2,9
N	CVSP 89	1	1,47
TOTAL		68	100

Fuente: (Autor, 2019)

La tabla 9 muestra el porcentaje de presentación de los genes de resistencia en dependencia del origen de las muestras de *E. coli* obtenidas. En cuanto a las 48 muestras obtenidas de perros domésticos, el 93,8% presentaron el gen *bla*_{CTX-M}; el 75% fue positivo al gen *bla*_{TEM}; el 8,3% correspondió al gen *bla*_{SHV} y el 2,1% amplificó al gen *bla*_{CMY}. Por otro lado, de las 20 muestras tomadas de perros callejeros el 85% corresponde a genes de tipo *bla*_{CTX-M}, el 45% son positivas al gen *bla*_{TEM}, no existe amplificación de genes de tipo *bla*_{SHV} y el 15% presentaron el gen *bla*_{CMY}.

Tabla 9. Porcentaje de presentación de genes de resistencia dependiendo del origen de la muestra.

ORIGEN	MUESTRAS	<i>bla</i> _{CTX-M}	%	<i>bla</i> _{TEM}	%	<i>bla</i> _{SHV}	%	<i>bla</i> _{CMY}	%
<i>Domésticos</i>	48	45	93,8	36	75	4	8,3	1	2,1
<i>Callejeros</i>	20	17	85	9	45	0	0	3	15
TOTAL	68	62		45		4		4	

Fuente: (Autor, 2019)

En la tabla 10 se pueden observar las características epidemiológicas de las muestras.

Tabla 10. Porcentaje de las características epidemiológicas basadas en las 68 muestras aisladas en caninos de la ciudad de Ambato.

Sexo (N°/%)	Categorías de edad (N°/%)	Origen muestra (N°/%)	Motivo de consulta (N°/%)
Macho (39/57,35%)	PED (24/35,29%)	Doméstico CVSP (41/60,29%)	DER (1/1,47%)
		Doméstico CVPP (7/10,29%)	DIS (2/2,94%)
Hembra (29/42,65%)	GER (9/13,24%)	Callejero (17/25%)	HAB (4/5,88%)
		Callejero HDV (3/4,41%)	ITX (1/1,47%)
			NPL (1/1,47%)
			ORQ (2/2,94%)
			OSA (2/2,94%)
			PTM (1/1,47%)
			S (31/45,59%)
			GES (1/1,47%)
			TBR (4/5,88%)
			NEU (1/1,47%)
			VIN (2/2,94%)
			GTX (10/14,71%)
	PVS (5/7,35%)		

PED: pediátricos (≤ 18 meses); ADL: adultos (18 meses-10 años); GER: geriátrico (> 10 años); DER: dermatitis; DIS: distemper; HAB: herida abrasiva; ITX: intoxicación; NPL: neoplasias; ORQ: orquiectomía; OSA: osteoartritis; PTM: politraumatizado; S: sano; GES: gestante; TBR: traqueobronquitis; NEU: neumonía; VIN: intosucepción; GTX: gastroenteritis; PVS: parvovirus.

Fuente: (Autor, 2019)

Las características epidemiológicas de los aislados indican que, en cuanto al sexo, el mayor porcentaje de aislamientos corresponde a machos (57,35%); por otro lado, la

población de categoría adulta presenta un mayor porcentaje de casos de resistencia (51,47%) sin omitir que la categoría pediátrica tiene un importante número de casos (35,29%); los perros de origen doméstico presentan una elevada tasa de resistencia con un porcentaje de 70,59% (Doméstico CVSP + Doméstico CVPP), frente a un 29,41% de perros callejeros (Callejeros + Callejero HDV); finalmente el 45,59% de aislados corresponde a perros que llegaron a consulta no por enfermedad sino por controles preventivos, es decir, pacientes sanos. Es importante mencionar que los pacientes que llegaron a consulta por gastroenteritis presentan un alto porcentaje de aislados (14,71%).

Tabla 11 Porcentaje de características epidemiológicas basadas en las 148 muestras iniciales

Sexo (N°/%)	Categorías de edad (N°/%)	Origen muestra (N°/%)	Motivo de consulta (N°/%)
Macho (39/ 26,4%)	PED (24/16,2%)	Doméstico (48/32,4%)	Sanos (31/21%)
Hembra (29/ 19,6%)	ADL (35/23,7%)	Callejero (20/13,5%)	Enfermos (37/25%)
	GER (9/6,1%)		

Ensayos de conjugación

Tomando en cuenta el perfil de resistencia de las muestras realizado en un anterior ensayo, se realizó un análisis jerárquico de conglomerados utilizando el software MeV. El árbol de análisis jerárquico se dividió en 8 conglomerados agrupados según su perfil de susceptibilidad frente al panel de antimicrobianos testeados.

De cada conglomerado se tomó una cepa al azar y se la conjugó con una cepa receptora: *E. coli* J53 resistente a azida de sodio (AZ^r). La tabla 11 muestra los resultados de la transferencia de genes de resistencia detectada por medio de PCR.

Tabla 12. Resultados de la transconjugación entre cepa donadora y *E. coli* J53.

C	TC	DONANTE	ORIGEN	BACTERIA DONANTE				TRANSCONJUGADOS			
				<i>bla</i> TEM	<i>bla</i> CTXM	<i>bla</i> SHV	<i>bla</i> CMY	<i>bla</i> TEM	<i>bla</i> CTXM	<i>bla</i> SHV	<i>bla</i> CMY

C1	J53	CVSP 73a	Doméstico CVSP	-	+	-	-	+	+	-	-
C2	J53	C30	Callejero	+	+	-	-	+	+	-	-
C3	J53	CVSP 93	Doméstico CVSP	+	+	-	+	+	+	-	+
C4	J53	CVSP 62a	Doméstico CVSP	+	+	-	-	+	+	-	-
C5	J53	CVSP 81a	Doméstico CVSP	-	+	-	-	+	+	-	-
C7	J53	CVSP 43s	Doméstico CVSP	+	+	-	-	+	+	-	-
C8	J53	CVSP 76a	Doméstico CVSP	-	+	-	-	+	+	-	-

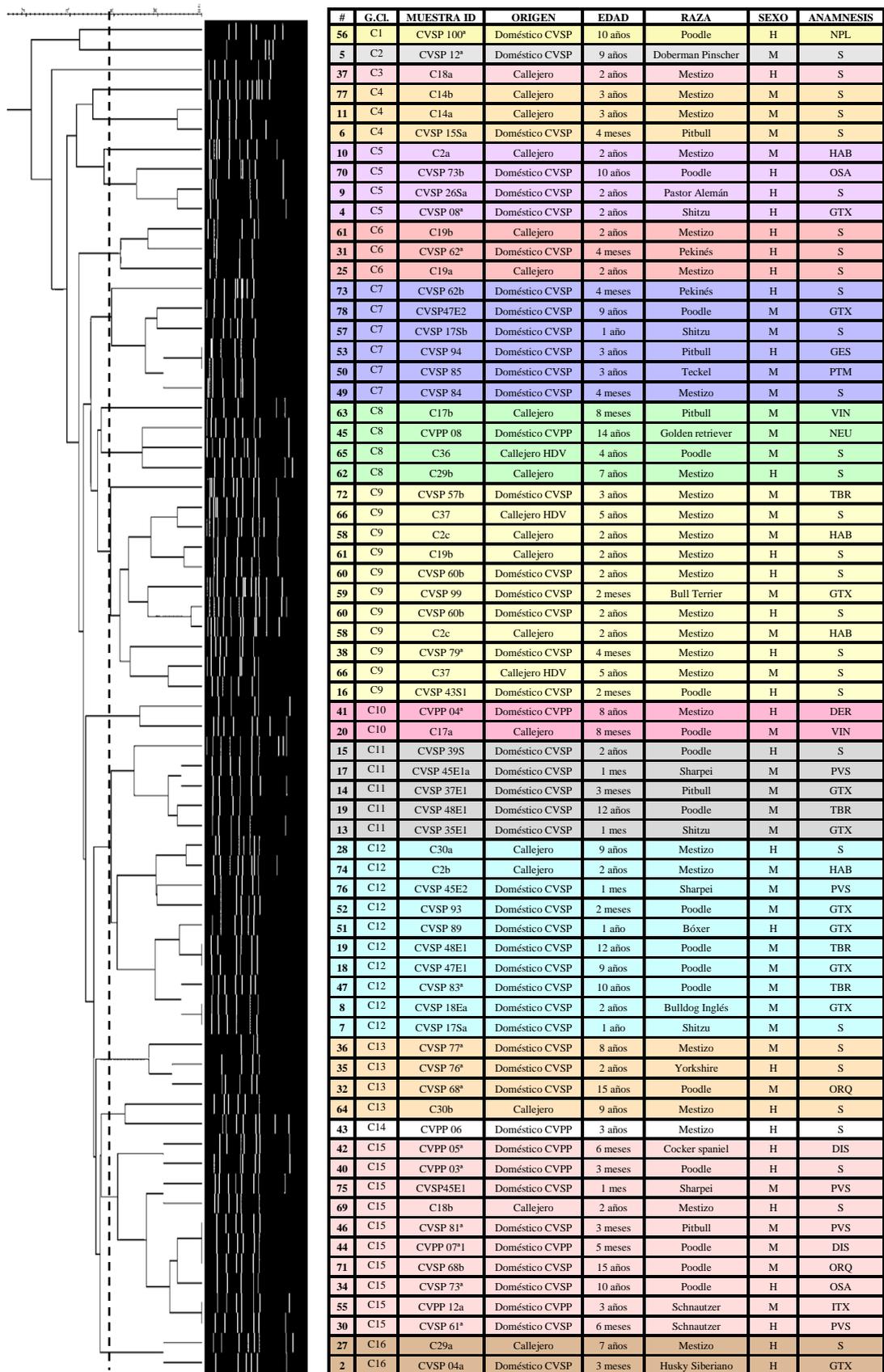
Todas las bacterias evaluadas transfirieron sus mecanismos de resistencia a β -lactámicos a la bacteria receptora, sugiriendo que estos genes se encuentran codificados dentro de plásmidos.

Evaluación la diversidad clonal de los genes de resistencia a betalactámicos en aislados de *E. coli*.

El dendograma se obtuvo mediante el uso del programa GelJ; además la similitud entre cepas se analizó mediante el índice de Dice, por el Método de Pares no Ponderados utilizando una Media Aritmética (UPGMA).

La diversidad clonal entre las cepas analizadas es demostrada en este árbol, en el cual se consideró una similitud mayor o igual a un 80% para agrupar las cepas en un mismo clon.

Figura 4. Dendrograma de los 68 aislados de *E. coli* procedentes de caninos de Ambato.



El grupo clonal C4 presenta 3 aislamientos con 1 subtipo de los cuales dos pertenecen a un mismo origen callejero y uno a un origen doméstico (CVSP). Las cepas C1, C2 y C3 presentan un porcentaje de similitud bajo (72%, 72% y 65% respectivamente), por lo que se las considera como posiblemente relacionadas con el grupo clonal C4.

Los grupos C5 y C6 presentan 4 aislamientos con 2 subtipos, y 3 aislamientos con 1 subtipo respectivamente; en ambos grupos los aislamientos varían su origen entre callejero y doméstico (CVSP).

El grupo C7 presenta 6 aislados con 3 subtipos, todos pertenecientes al mismo origen, mientras que el grupo C8 contiene 4 aislados con 1 subtipo y de orígenes variados.

Los grupos C9, C10, C12, C13, C14 y C15 presentan 11, 2, 10, 4, 11 y 2 aislados, y 4, 3, 4, 2, 5 y 1 subtipos respectivamente, distribuidos en distintos orígenes tanto domésticos como callejeros. El grupo C11 presenta 5 aislados con tres subtipos ubicados en un mismo origen doméstico (CVSP).

En grupos como C7, C9, C12 y C15 se evidencian cepas indistinguibles entre sí al poseer un patrón clonal igual; en la mayoría de grupos clonales se observa que las cepas están genéticamente reacionadas y tienen orígenes distintos lo que nos indica que poseen un ancestro común circundante.

Análisis jerárquico de los mecanismos de resistencia genotípica a β -lactámicos.

El análisis jerárquico de conglomerados se realizó usando los resultados de la presencia de los genes de resistencia en los aislados de *E. coli*, resultando en la agrupación de ocho grupos (conglomerados) diferenciados por la presencia de uno, dos, tres o ningún gen de resistencia.

El clúster 1 (CR1) contiene dos cepas que fueron positivas a los genes *bla_{TEM}* y *bla_{SHV}*; el CR2 corresponde a dos cepas que contienen los genes *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}* y *bla_{SHV}*; el CR3 corresponde a 20 cepas que amplificaron el gen *bla_{CTX-M}*; el CR4 contiene 39 cepas que mostraron los genes *bla_{TEM}* y *bla_{CTX-M}*; el CR5 corresponde a una única cepa que amplificó los genes *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}* y *bla_{CMY}*; la cepa que corresponde al CR6 amplificó los genes *bla_{TEM}* y *bla_{CMY}*; el CR7 contiene dos cepas que amplificaron el gen *bla_{CMY}* y finalmente el CR8 que contiene una sola cepa que no amplificó ninguno de los cuatro genes de resistencia a betalactámicos.

Figura 5. Árbol jerárquico de los resultados de la presencia de los cuatro genes de resistencia a betalactámicos de las 68 cepas analizadas, donde:

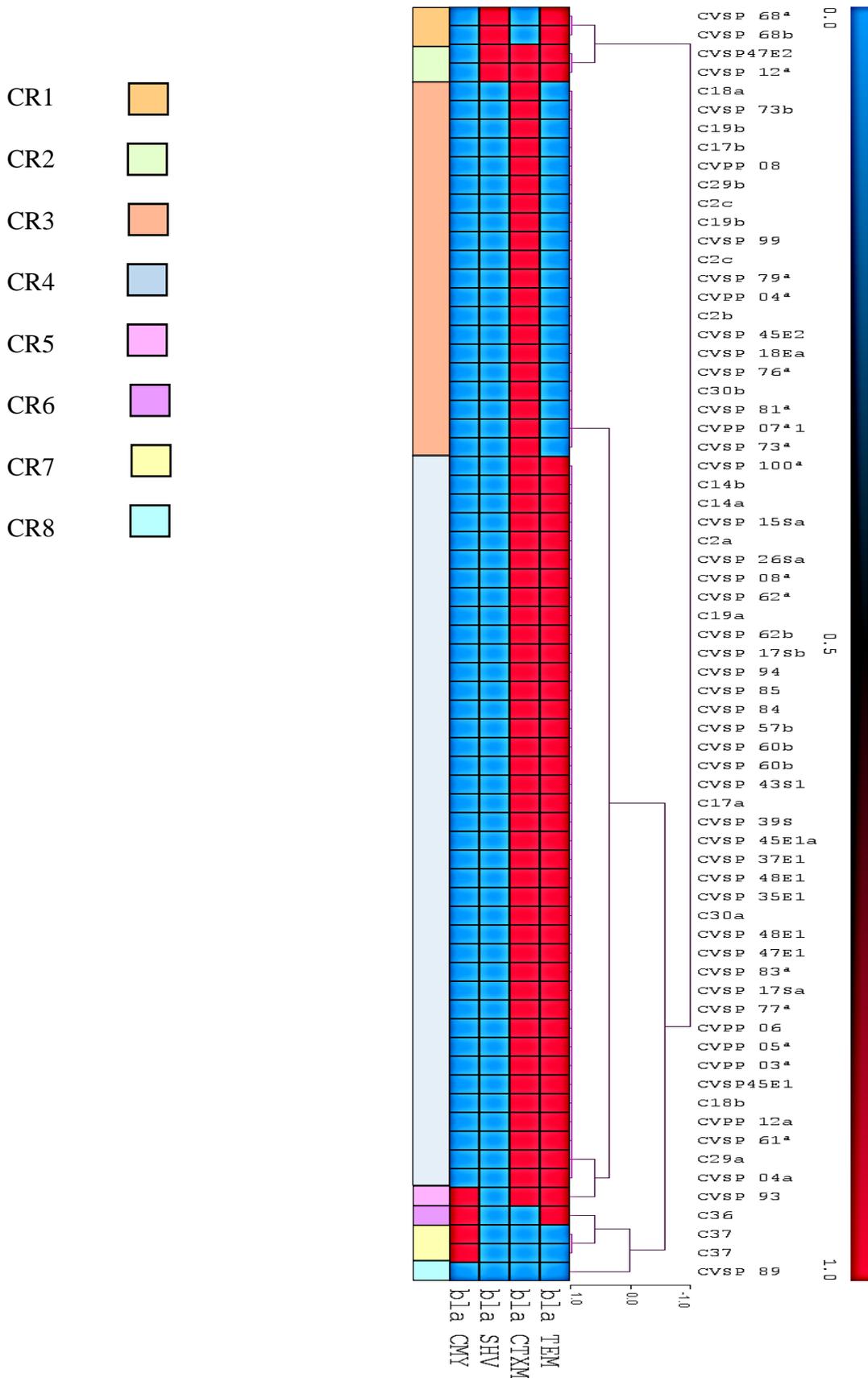


Tabla 13. Detalle de cada aislado agrupado por conglomerados.

#	C. RESIST	MUESTRA	ORIGEN	EDAD	RAZA	SEXO	ANAMNESIS
32	CR1	CVSP 68a	Doméstico CVSP	15 años	Poodle	M	ORQ
71	CR1	CVSP 68b	Doméstico CVSP	15 años	Poodle	M	ORQ
5	CR2	CVSP 12a	Doméstico CVSP	9 años	Doberman Pinscher	M	S
78	CR2	CVSP47E2	Doméstico CVSP	9 años	Poodle	M	GTX
63	CR3	C17b	Callejero	8 meses	Pitbull	M	VIN
37	CR3	C18a	Callejero	2 años	Mestizo	H	S
61	CR3	C19b	Callejero	2 años	Mestizo	H	S
61	CR3	C19b	Callejero	2 años	Mestizo	H	S
62	CR3	C29b	Callejero	7 años	Mestizo	H	S
74	CR3	C2b	Callejero	2 años	Mestizo	M	HAB
58	CR3	C2c	Callejero	2 años	Mestizo	M	HAB
58	CR3	C2c	Callejero	2 años	Mestizo	M	HAB
64	CR3	C30b	Callejero	9 años	Mestizo	H	S
41	CR3	CVPP 04a	Doméstico CVPP	8 años	Mestizo	H	DER
44	CR3	CVPP 07a1	Doméstico CVPP	5 meses	Poodle	M	DIS
45	CR3	CVPP 08	Doméstico CVPP	14 años	Golden retriever	M	NEU
8	CR3	CVSP 18Ea	Doméstico CVSP	2 años	Bulldog Inglés	M	GTX
76	CR3	CVSP 45E2	Doméstico CVSP	1 mes	Sharpei	M	PVS
34	CR3	CVSP 73a	Doméstico CVSP	10 años	Poodle	H	OSA
70	CR3	CVSP 73b	Doméstico CVSP	10 años	Poodle	H	OSA
35	CR3	CVSP 76a	Doméstico CVSP	2 años	Yorkshire	H	S
38	CR3	CVSP 79a	Doméstico CVSP	4 meses	Mestizo	H	S
46	CR3	CVSP 81a	Doméstico CVSP	3 meses	Pitbull	M	PVS
59	CR3	CVSP 99	Doméstico CVSP	2 meses	Bull Terrier	M	GTX
11	CR4	C14a	Callejero	3 años	Mestizo	M	S
77	CR4	C14b	Callejero	3 años	Mestizo	M	S
20	CR4	C17a	Callejero	8 meses	Poodle	M	VIN
69	CR4	C18b	Callejero	2 años	Mestizo	H	S
25	CR4	C19a	Callejero	2 años	Mestizo	H	S
27	CR4	C29a	Callejero	7 años	Mestizo	H	S
10	CR4	C2a	Callejero	2 años	Mestizo	M	HAB
28	CR4	C30a	Callejero	9 años	Mestizo	H	S
40	CR4	CVPP 03a	Doméstico CVPP	3 meses	Poodle	H	S
42	CR4	CVPP 05a	Doméstico CVPP	6 meses	Cocker spaniel	H	DIS

#	C. RESIST	MUESTRA	ORIGEN	EDAD	RAZA	SEXO	ANAMNESIS
43	CR4	CVPP 06	Doméstico CVPP	3 años	Mestizo	H	S
55	CR4	CVPP 12a	Doméstico CVPP	3 años	Schnautzer	M	ITX
2	CR4	CVSP 04a	Doméstico CVSP	3 meses	Husky Siberiano	H	GTX
4	CR4	CVSP 08a	Doméstico CVSP	2 años	Shitzu	H	GTX
56	CR4	CVSP 100a	Doméstico CVSP	10 años	Poodle	H	NPL
6	CR4	CVSP 15Sa	Doméstico CVSP	4 meses	Pitbull	M	S
7	CR4	CVSP 17Sa	Doméstico CVSP	1 año	Shitzu	M	S
57	CR4	CVSP 17Sb	Doméstico CVSP	1 año	Shitzu	M	S
9	CR4	CVSP 26Sa	Doméstico CVSP	2 años	Pastor Alemán	H	S
13	CR4	CVSP 35E1	Doméstico CVSP	1 mes	Shitzu	M	GTX
14	CR4	CVSP 37E1	Doméstico CVSP	3 meses	Pitbull	M	GTX
15	CR4	CVSP 39S	Doméstico CVSP	2 años	Poodle	H	S
16	CR4	CVSP 43S1	Doméstico CVSP	2 meses	Poodle	H	S
17	CR4	CVSP 45E1a	Doméstico CVSP	1 mes	Sharpei	M	PVS
18	CR4	CVSP 47E1	Doméstico CVSP	9 años	Poodle	M	GTX
19	CR4	CVSP 48E1	Doméstico CVSP	12 años	Poodle	M	TBR
19	CR4	CVSP 48E1	Doméstico CVSP	12 años	Poodle	M	TBR
72	CR4	CVSP 57b	Doméstico CVSP	3 años	Mestizo	M	TBR
60	CR4	CVSP 60b	Doméstico CVSP	2 años	Mestizo	H	S
60	CR4	CVSP 60b	Doméstico CVSP	2 años	Mestizo	H	S
30	CR4	CVSP 61a	Doméstico CVSP	6 meses	Schnautzer	H	PVS
31	CR4	CVSP 62a	Doméstico CVSP	4 meses	Pekínés	H	S
73	CR4	CVSP 62b	Doméstico CVSP	4 meses	Pekínés	H	S
36	CR4	CVSP 77a	Doméstico CVSP	8 años	Mestizo	M	S
47	CR4	CVSP 83a	Doméstico CVSP	10 años	Poodle	M	TBR
49	CR4	CVSP 84	Doméstico CVSP	4 meses	Mestizo	M	S
50	CR4	CVSP 85	Doméstico CVSP	3 años	Teckel	M	PTM
53	CR4	CVSP 94	Doméstico CVSP	3 años	Pitbull	H	GES
75	CR4	CVSP45E1	Doméstico CVSP	1 mes	Sharpei	M	PVS
52	CR5	CVSP 93	Doméstico CVSP	2 meses	Poodle	M	GTX
65	CR6	C36	Callejero HDV	4 años	Poodle	M	S
66	CR7	C37	Callejero HDV	5 años	Mestizo	M	S
66	CR7	C37	Callejero HDV	5 años	Mestizo	M	S
51	CR8	CVSP 89	Doméstico CVSP	1 año	Bóxer	H	GTX

3.2 Discusión

Identificación de la presencia de genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} y *bla*_{CMY} de resistencia a betalactámicos en aislados de *E. coli*.

Se estima que aproximadamente el 80% del total de antibióticos a nivel mundial son administrados a animales; por lo tanto, los sectores veterinario y zootécnico representan los principales responsables de la aceleración del ritmo evolutivo en el resistoma bacteriano (Hsu et al. 2014; Martinez 2009; Sarmah, Meyer, and Boxall 2006). La mayoría de estudios de resistencia está enfocada a animales destinados al consumo humano, dejando de lado el análisis epidemiológico de los animales de compañía que podrían representar reservorios de bacterias resistentes y multirresistentes y son un potencial vector hacia el ser humano, ya que comparten estrechamente nichos ecológicos (Carvalho et al. 2016; Finch et al. 2010; Ortega-Paredes et al. 2019).

La presencia de bacterias resistentes a betalactámicos se detectan cada vez con mayor frecuencia en muestras caninas, lo que resulta alarmante por el hecho de que este grupo de antimicrobianos son el de elección fundamental en la práctica médica, tanto humana como veterinaria (Medina Morales et al. 2015). En nuestro país, las investigaciones acerca de la resistencia bacteriana a betalactámicos ha sido limitada. Los organismos de control sanitario aún no han logrado frenar el uso indebido de antimicrobianos administrados en la práctica veterinaria empírica, lo que conlleva a una mayor exposición de las bacterias a estos, lo que desemboca en mutaciones y adquisición de material genético que codifica mecanismos de resistencia (Gestal and Villacís 2014; INSPI 2016; Ministerio de Salud 2018; Ministerio de Salud Pública del Ecuador 2019; Salud 2014; Villacís 2017). No hay que dejar de lado que varias investigaciones sugieren que el consumo de alimentos de origen animal ha aportado a la aparición de genes de resistencia en animales de compañía que no han tenido contacto con otras especies (Sun et al. 2017). Nuestros resultados sugieren el potencial rol zoonótico de los perros como reservorios de bacterias multirresistentes, ya que fueron detectados

genes de resistencia a betalactámicos de interés de salud pública con una elevada frecuencia, independientemente de la patología diagnosticada.

Este estudio revela que hay una elevada presencia de genes de resistencia a betalactámicos en aislados de caninos provenientes de una misma zona geográfica (Ambato); de las 68 muestras BLEE, el 91,18% (n=62) amplificaron el gen *bla_{CTX-M}* identificándose como el gen con mayor tasa de expresión; resultados similares se obtuvieron en China, Estados Unidos y Brasil, donde el 100% de las muestras aisladas de caninos amplificaron el gen *bla_{CTX-M}* (Melo et al. 2018; Shaheen et al. 2011; Sun et al. 2010); estos resultados e indicios muestran una importante presencia del gen *bla_{CTX-M}* en caninos, y es una muestra de su potencial diseminación mundial. En cuanto al origen de las muestras, este gen manifestó un mayor porcentaje de presentación en caninos domésticos que en caninos callejeros (70,6% vs 29,4%).

Con respecto al gen *bla_{TEM}* también presentó un alto porcentaje de expresión, 66,2% (n=45/68); y al igual que en el anterior gen, se presentó en un porcentaje superior en los aislamientos de origen doméstico (75%, n= 36/48) en relación a los de origen callejero (45%, n= 9/20). En un estudio realizado en Brasil, detectaron que el 19 % de aislamientos de *E. coli* canino portaban este gen como único BLEE o en combinación (n= 8/42) (Carvalho et al. 2016). En los Países Bajos, el 13.8% (n=4/29) de aislamientos de animales de compañía con fenotipo BLEE presentaron el gen de resistencia *bla_{TEM}*, solo o en combinación (Dierikx et al. 2012). Un futuro estudio podría analizar las variantes pertenecientes este gen, considerando que su presencia es notable en contraste con aislamientos de otros orígenes.

En el caso del gen *bla_{SHV}*, detectándose aislamientos positivos únicamente en muestras de perros con dueño (5.9 % total, 8.3% en perros domésticos). La presencia de este gen BLEE no es muy frecuente en aislamientos de origen canino. Por ejemplo, en un estudio realizado en Suiza, detectaron la presencia de este gen en aislamientos de *E.*

cloacae y *K. pneumoniae*, siendo negativos para los aislamientos de *E. coli* (Zogg et al. 2018). En México, en un estudio realizado en 53 perros sanos, únicamente se detectó en una muestra positiva (Rocha-Gracia et al. 2015). Los aislamientos caninos de *E. coli* portadores de *bla*_{SHV} poseen un perfil de multirresistencia antibiótica en un estudio realizado en España (Alonso et al. 2017). Un estudio realizado en Suiza identificó la presencia de este gen en perros hogareños y sus dueños, quienes confirmaron que más de una vez se compartieron comida y utensilios (Ljungquist et al. 2016). En el año 2015 en Suiza se realizaron estudios de diferentes fuentes alimenticias destinadas al consumo de perros domésticos, incluyendo dietas comerciales, hallándose la presencia del gen *bla*_{SHV} en aquellas que no habían sido tratadas térmicamente sin importar si fueron de alguna marca comercial o no (Nilsson 2015). En el caso de este estudio, este gen se lo detectó únicamente en combinación con otras enzimas BLEE (Tabla 8), por lo que se puede sugerir que dichos aislamientos poseen multirresistencia y una elevada virulencia.

En el caso de la betalactamasas de tipo AmpC, el gen *bla*_{CMY} fue detectado en una muestra de perro con dueño y tres de perros callejeros. Este gen es habitualmente detectado en muestras con fenotipo AmpC, como los observados en un estudio holandés en el cual el 50% (n= 11/22) de los aislamientos de enterobacterias AmpC positivas, provenientes de animales de compañía, poseían este gen en diversas variantes (Dierikx et al. 2012). La presencia de este gen ha sido detectada en muestras de *Salmonella* aisladas de carne cruda de diferentes animales (Nair, Venkitanarayanan, and Johnny 2018). Un estudio realizado en Suiza detectó la presencia de este gen en aislados de *E. coli* obtenidos de muestras de perros que fueron alimentados con una dieta basada en alimentos crudos (Ljungquist et al. 2016), por lo que se puede sugerir que la presencia de este gen en aislados de *E. coli* de origen canino está relacionada directamente con la dieta de los animales; cabe mencionar que los animales de origen callejero no cuentan con una fuente constante de alimento y muchas de las veces consumen restos de origen animal o vegetal crudos o con una cocción deficiente. Desafortunadamente, este estudio no cuenta con información referente a los hábitos dietarios de los animales muestreados.

Por lo expuesto, los aislamientos provenientes de perros con dueño poseen una mayor tasa de detección de genes de resistencia a β -lactámicos en contraste a los animales callejeros (Tabla 10). De la misma forma, se observó una mayor tasa de detección en aislamientos provenientes de animales adultos. La presencia de estos genotipos no está ligada exclusivamente a enfermedades gastrointestinales, ya que se observó que provienen de animales diagnosticados con una gran diversidad de patologías y también de animales sanos (Tabla 10). Por lo que se puede sugerir que los perros representan portadores silenciosos de bacterias entéricas con genes de resistencia de interés epidemiológico.

En los ensayos de conjugación (Tabla 11) se determinó que las bacterias evaluadas (tomadas al azar) podían eficientemente transferir sus plásmidos de resistencia a una bacteria receptora. Esto es un indicador de que las bacterias provenientes de perros podrían participar en eventos de transferencia genética horizontal en los microbiomas donde se encuentren presentes, y que los genes de resistencia BLEE se encuentran codificados en plásmidos (**Tenover 2006**). Los residuos fecales de perros podrían representar un vector de transmisión de bacterias multirresistentes, con capacidad de transferir sus mecanismos de resistencia a la microbiota humana. Por lo cual, la gestión de los residuos de los animales domésticos, así como ciertas prácticas de contacto mascota-propietario deberían ser revisados, en especial en personas con el sistema inmunológico disminuido.

Evaluación de la diversidad clonal de los genes de resistencia a betalactámicos en aislados de *E. coli*.

Con la finalidad de evaluar el grado de relación existente entre los aislamientos positivos, se realizó la evaluación de la diversidad clonal utilizando un marcador de regiones repetitivas palindrómicas (GTG5). La figura 4 detalla el árbol jerárquico de estos aislamientos, observándose una elevada diversidad clonal (16 clústers) independientes del origen, tipo de muestra, edad, raza, sexo y anamnesis. Este resultado es consistente con otros estudios, en los cuales su diversidad clonal no está atribuida a su repertorio de genes de resistencia (**Carvalho et al. 2016; Tenailon et**

al. 2010). Los genes de resistencia evaluados se encuentran mayoritariamente codificados en plásmidos (**Ghafourian et al. 2015**), y las regiones repetitivas palindrómicas se encontrarán en su mayoría en el cromosoma (**Mohapatra et al. 2007**). La diversidad microbiana depende en gran medida de los factores abióticos y bióticos circundantes, como el tipo de dieta y contacto con otros animales y humanos (**Dethlefsen, McFall-Ngai, and Relman 2007**); por lo que, en un estudio complementario, se podría analizar en qué medida los aislamientos de origen canino se relacionan con los de sus dueños y con los de los alimentos ingeridos, para detectar posibles rutas de transmisión y elucidar en parte esta elevada diversidad genética entre los aislamientos de *E. coli* de origen canino.

Análisis jerárquico de los mecanismos de resistencia fenotípica a β -lactámicos

En relación a la diversidad de genes de resistencia a betalactámicos, se obtuvieron ocho grupos de acuerdo a su diversidad (Figura 5). Es de considerable interés los grupos 2 (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M}) y 5 (*bla*_{TEM}, *bla*_{CMY} y *bla*_{CTX-M}) los cuales albergan hasta tres genes cada uno. Los aislamientos del grupo 2 pertenecen a animales adultos, con dueño, masculinos, de diferentes razas y anamnesis (sano y con gastroenteritis) (Tabla 12). El miembro del grupo 5, en cambio, pertenece a un paciente pediátrico, masculino, raza Poodle, diagnosticado con gastroenteritis. En el dendograma de diversidad genética (Figura 4), estos aislamientos provienen de diversos orígenes genéticos, por lo que se descarta que puedan provenir de clones multirresistentes con un ancestro en común reciente. Se sugiere que estas bacterias fueron adquiriendo sus mecanismos de resistencia por transferencia genética horizontal en eventos evolutivos recientes y que no guardan relación con un brote en específico. La mayoría de microorganismos evaluados poseen los genes *bla*_{CTX-M} y *bla*_{TEM} en conjunto, la cual es una interacción observada en aislamientos multirresistentes de caninos y otros animales de compañía (**Alonso et al. 2017; Dierikx et al. 2012**).

Los datos obtenidos de la presente investigación ratifican que el uso inapropiado de antibióticos β -lactámicos en animales de compañía instaura un factor de riesgo alto para la diseminación de genes de resistencia debido a la rápida adaptación de las

bacterias para su supervivencia, estableciendo un potencial riesgo para la salud pública debido al estrecho vínculo con el ser humano (**Ayasta Salazar 2017; De Gomar 2018; Nägele 2019; Rubin and Pitout 2014; Wedley et al. 2017**). Al ser *Escherichia coli* una bacteria que forma parte de la microbiota normal del perro que, en casos de desequilibrios en su microambiente puede volverse un patógeno nosocomial, su excreción a través de las heces y prácticas etológicas propias del perro como el olfateo y el lamido, la vuelven fácilmente transmisible por vía fecal-oral-nasal (**Dierikx et al. 2012; Espinosa Alberca 2017; Kawamura et al. 2017**).

Diversas investigaciones también señalan la contaminación de la materia prima de origen animal desde el animal en pie como una causa frecuente de propagación de genes de resistencia de tipo *bla_{SHV}* y *bla_{CMY}*, ya sea por el uso de antibióticos promotores de crecimiento o la administración de β -lactámicos como primera opción en la clínica de grandes especies destinadas al consumo (**Alonso et al. 2017; Carvalho et al. 2020; Da Costa, Loureiro, and Matos 2013; Gundran et al. 2019; Vardaro et al. 2016; Vivanco 2016**).

Los animales callejeros se encuentran a expensas del medio ambiente que, recientemente ha destacado su papel en el origen y la evolución de resistencia a antibióticos (Berglund 2015). Los ambientes acuáticos como: ríos, descargas de aguas residuales, drenaje de alcantarillado, etc., han recibido una especial atención, ya que pueden facilitar el transporte y por consiguiente la diseminación de determinantes de resistencia a antibióticos (**Aminov & Mackie, 2007; Calero-Cáceres et al., 2017; Colomer-Lluch et al., 2014; Czekalski et al., 2014; Piedra-Carrasco 2017**).

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES, RECOMENDACIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS

4.1 CONCLUSIONES

- En cuanto a la presencia de genes de resistencia a betalactámicos, se identificó que el gen con la mayor tasa de presentación fue *bla*_{CTX-M}, encontrándose en perros de origen doméstico en mayor proporción, el gen *bla*_{TEM} también presentó un alto porcentaje de expresión en perros domésticos, la detección del gen *bla*_{SHV} no fue tan frecuente y solo se presentó en combinación con los otros genes en muestras de perros domésticos, finalmente el gen *bla*_{CMY} se identificó en mayor porcentaje en perros callejeros, además presentó combinación con los genes *bla*_{CTX-M} y *bla*_{TEM}.
- Se evaluó la diversidad clonal de los aislados de *E. coli*, detectándose una elevada diversidad clonal representada en 16 distintos clústers, infiriendo en la existencia de una gran cantidad de linajes circundantes que no son dependientes de las características epidemiológicas de origen, edad, sexo o motivo de anamnesis de los caninos de la ciudad de Ambato.
- El análisis del dendograma de diversidad genética descartó que los aislamientos provengan de clones multirresistentes con un ancestro común reciente por sus diferentes orígenes genéticos, indicando una posible transferencia genética horizontal para la adquisición de mecanismos de resistencia; mientras que el dendograma de genes de resistencia indica que los aislados, al dividirse en grupos, presentan un marcado perfil genotípico de resistencia con uno, dos o tres genes combinados.

4.1 RECOMENDACIONES

La compleja epidemiología implicada en la evolución de los mecanismos de resistencia a betalactámicos, sus reservorios y las vías de transmisión necesitan ser estudiadas con profundidad, por lo que es necesaria la realización de estudios complementarios con la finalidad de determinar si los aislamientos de *E. coli* de caninos están relacionados con aislamientos clínicos de humanos y del ambiente que los influencia. Los hallazgos de esa investigación resaltan la importancia de manejar apropiadamente los residuos fecales de los perros, así como deberían revisarse las interacciones existentes entre humanos y mascotas en determinadas circunstancias.

4.2 BIBLIOGRAFÍA

- Abarca, Gabriela and Marco Luis Herrera. 2001. "Betalactamasas: Su Importancia En La Clínica y Su Detección En El Laboratorio." *Rev. Méd. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica)*.
- Alonso, Carla Andrea, Geovana Brenner Michael, Jun Li, Sergio Somalo, Carmen Simón, Yang Wang, Heike Kaspar, Kristina Kadlec, Carmen Torres, and Stefan Schwarz. 2017. "Analysis of Bla SHV-12 -Carrying Escherichia Coli Clones and Plasmids from Human, Animal and Food Sources." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72(6):1589–96.
- Aminov, Rustam I. and Roderick I. Mackie. 2007. "Evolution and Ecology of Antibiotic Resistance Genes." *FEMS Microbiology Letters* 271(2):147–61.
- Aslantas, Özkan and Ebru Şebnem Yilmaz. 2017. "Prevalence and Molecular Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL) and Plasmidic AmpC β -Lactamase (PAmpC) Producing Escherichia Coli in Dogs." *Journal of Veterinary Medical Science* 79(6):1024–30.
- Ayala, Anamariela Tijerino, Hilda María Bolaños Acuña, María Teresa Acuña Calvo, José Luis Vargas Morales, and Elena Campos Chacón. 2016. "Emergencia de β -Lactamasa AmpC Plasmídica Del Grupo CMY-2 En Shigella Sonnei y Salmonella Spp. En Costa Rica, 2003-2015." *Revista Panamericana*

de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health 40(1):70–75.

Ayasta Salazar, Lisette. 2017. “TENENCIA DE CANES (Canis Familiaris) EN JÓVENES DE 13- 14 AÑOS DE LA POBLACIÓN ESTUDIANTIL SECUNDARIA DEL DISTRITO DE MONSEFÚ SETIEMBRE- DICIEMBRE 2017.” *”Estrategias De Habilidades Sociales Para Mejorar La Retencion De Los Alumnos Del Ceba San Carlos De Bambamarca. 2016* 1–82.

Berglund, Björn. 2015. “Environmental Dissemination of Antibiotic Resistance Genes and Correlation to Anthropogenic Contamination with Antibiotics.” *Infection Ecology & Epidemiology* 5:28564.

Braem, G., S. De Vlieghe, K. Supré, F. Haesebrouck, F. Leroy, and L. De Vuyst. 2011. “(GTG)5-PCR Fingerprinting for the Classification and Identification of Coagulase-Negative Staphylococcus Species from Bovine Milk and Teat Apices: A Comparison of Type Strains and Field Isolates.” *Veterinary Microbiology* 147(1–2):67–74.

Calero-Cáceres, William, Javier Méndez, Julia Martín-Díaz, and Maite Muniesa. 2017. “The Occurrence of Antibiotic Resistance Genes in a Mediterranean River and Their Persistence in the Riverbed Sediment.” *Environmental Pollution*.

Carvalho, A. C., A. V. Barbosa, L. R. Arais, P. F. Ribeiro, V. C. Carneiro, and A. M. F. Cerqueira. 2016. “Resistance Patterns, ESBL Genes, and Genetic Relatedness of Escherichia Coli from Dogs and Owners.” *Brazilian Journal of Microbiology* 47(1):150–58.

Carvalho, Isabel, Carla Andrea Alonso, Vanessa Silva, Paulo Pimenta, Rita Cunha, Carla Martins, Gilberto Igrejas, and Carmen Torres. 2020. “Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Klebsiella Pneumoniae Isolated from Healthy and Sick Dogs in Portugal.” 00(00):1–7.

Colomer-Lluch, Marta, William Calero-Cáceres, Sihem Jebri, Fatma Hmaied, Maite Muniesa, and Juan Jofre. 2014. “Antibiotic Resistance Genes in Bacterial and Bacteriophage Fractions of Tunisian and Spanish Wastewaters as Markers to Compare the Antibiotic Resistance Patterns in Each Population.” *Environment*

International 73:167–75.

- Colomer-Lluch, Marta, Lejla Imamovic, Juan Jofre, and Maite Muniesa. 2011. “Bacteriophages Carrying Antibiotic Resistance Genes in Fecal Waste from Cattle, Pigs, and Poultry.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55(10):4908–11.
- Colomer-Lluch, Marta, Juan Jofre, and Maite Muniesa. 2011. “Antibiotic Resistance Genes in the Bacteriophage DNA Fraction of Environmental Samples.” *PLoS ONE* 6(3).
- Da Costa, Paulo Martins, Luís Loureiro, and Augusto J. F. Matos. 2013. “Transfer of Multidrug-Resistant Bacteria between Intermingled Ecological Niches: The Interface between Humans, Animals and the Environment.” *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10(1):278–94.
- Czekalski, Nadine, Elena Gascón Díez, and Helmut Bürgmann. 2014. “Wastewater as a Point Source of Antibiotic-Resistance Genes in the Sediment of a Freshwater Lake.” *The ISME Journal* 1381–90.
- Czekalski, Nadine, Radhika Sigdel, Julia Birtel, Blake Matthews, and Helmut Bürgmann. 2015. “Does Human Activity Impact the Natural Antibiotic Resistance Background? Abundance of Antibiotic Resistance Genes in 21 Swiss Lakes.” *Environment International* 81:45–55.
- Dethlefsen, Les, Margaret McFall-Ngai, and David A. Relman. 2007. “An Ecological and Evolutionary Perspective on Human-Microbe Mutualism and Disease.” *Nature* 449(7164):811–18.
- Dierikx, C. M., E. van Duijkeren, A. H. W. Schoormans, A. van Essen-Zandbergen, K. Veldman, A. Kant, X. W. Huijsdens, K. van der Zwaluw, J. A. Wagenaar, and D. J. Mevius. 2012. “Occurrence and Characteristics of Extended-Spectrum- β -Lactamase- and AmpC-Producing Clinical Isolates Derived from Companion Animals and Horses.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67(6):1368–74.
- Espinosa Alberca, Eunice Elizabeth. 2017. “AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE *Escherichia Coli* RESISTENTES A BETALACTÁMICOS DE

ESPECTRO EXTENDIDO MEDIANTE AISLAMIENTO BACTERIANO DE CANINOS EN LA ZONA URBANA DE QUITO.” Universidad Central del Ecuador.

Finch, Roger, John FitzGerald, Peter Hawkey, and Chris Teale. 2010. *ESBLs – A Threat to Human and Animal Health ?*

Gestal, Mónica Cartelle and José Eduardo Villacís. 2014. “Superbugs, Ecuador y El Futuro.” *Facultad de Ciencias Médicas de La Universidad de Guayaquil* 17(2):56–61.

Gevers, Dirk, Geert Huys, and Jean Swings. 2001. “Applicability of Rep-PCR Fingerprinting for Identification of Lactobacillus Species.” *FEMS Microbiology Letters* 205(1):31–36.

Ghafourian, Sobhan, Nourkhoda Sadeghifard, Sara Soheili, and Zamberi Sekawi. 2015. “Extended Spectrum Beta-Lactamases: Definition, Classification and Epidemiology.” *Curr. Issues Mol. Biol.* 17:11–22.

Gniadkowski, M. 2001. “Evolution and Epidemiology of Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBLs) and ESBL-Producing Microorganisms.” *Clinical Microbiology and Infection* 7(11):597–608.

De Gomar, Talia. 2018. “Beneficios Psicológicos y Cardiovasculares de Un Programa de Visitas de Mascotas Durante El Ingreso Hospitalario.”

González-De La Cruz, J. Ulises, H. Delfin-González, Ma C. De La Cruz-Leyva, R. A. Rojas-Herrera, and M. Zamudio-Maya. 2011. “Protocolo Para La Extracción de Adn Metagenómico Bacteriano Del Langostino Macrobrachium Carcinus L.” *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 14(3):875–83.

González Mesa, Leonora, Astrid Ramos Morí, Loreta Nadal Becerra, Janet Morffi Figueroa, Ernesto Hernández Robledo, Ana Berta Álvarez, Juan J. Marchena Bequer, Mabel González Alemán, and Carlos Vallin Plous. 2007. “Identificación Fenotípica y Molecular de β -Lactamasas de Espectro Extendido TEM y SHV Producidas Por Escherichia Coli y Klebsiella Spp. Aislados Clínicos de Hospitales.” *Revista Cubana de Medicina Tropical* 59(1):52–58.

- Gundran, Romeo S., Paul A. Cardenio, Marvin A. Villanueva, Fredelon B. Sison, Carolyn C. Benigno, Kwanchai Kreausukon, Duangporn Pichpol, and Veerasak Punyapornwithaya. 2019. "Prevalence and Distribution of Bla CTX-M, Bla SHV, Bla TEM Genes in Extended- Spectrum β - Lactamase- Producing E. Coli Isolates from Broiler Farms in the Philippines." *BMC Veterinary Research* 15(1):1–8.
- Hernández, Yenney, Evelyn Lobo, Siomara Martínez, and Loidy Zamora. 2009. "Evaluación De Diferentes Métodos De Extracción De Adn De Micoplasmas Para Su Empleo En El Diagnóstico Por Pcr." *Revista de Salud Animal* 31(2):108–14.
- Hordijk, Joost, Anky Schoormans, Mandy Kwakernaak, Birgitta Duim, Els Broens, Cindy Dierikx, Dik Mevius, and Jaap A. Wagenaar. 2013. "High Prevalence of Fecal Carriage of Extended Spectrum β -Lactamase/AmpC-Producing Enterobacteriaceae in Cats and Dogs." *Frontiers in Microbiology* 4:242.
- Hsu, Chao-Yu, Bing-Mu Hsu, Wen-Tsai Ji, Tien-Yu Chang, Po-Min Kao, Shao-Feng Tseng, Tsung-Yu Shen, Feng-Cheng Shih, Cheng-Wei Fan, and Jorn-Hon Liu. 2014. "A Potential Association Between Antibiotic Abuse and Existence of Related Resistance Genes in Different Aquatic Environments." *Water, Air, & Soil Pollution* 226(1):2235.
- INAMHI. 2014. *Anuario Meteorológico Nro 51-2011*. Vol. 51.
- INSPI. 2016. "Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana - Ecuador." 21.
- Kawamura, Kumiko, Tae Sugawara, Nao Matsuo, Kengo Hayashi, Chihiro Norizuki, Kiyoko Tamai, Takaaki Kondo, and Yoshichika Arakawa. 2017. "Spread of CTX-Type Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia Coli* Isolates of Epidemic Clone B2-O25-ST131 Among Dogs and Cats in Japan." *Microbial Drug Resistance* 23(8):1059–66.
- Li, Song, Junhe Liu, Yufa Zhou, and Zengmin Miao. 2017. "Characterization of ESBL-Producing *Escherichia Coli* Recovered from Companion Dogs in Tai'an, China." *Journal of Infection in Developing Countries* 11(3):282–86.
- Ljungquist, Oskar, Ditte Ljungquist, Mattias Myrenås, Cecilia Rydén, Maria Finn,

- and Björn Bengtsson. 2016. “Evidence of Household Transfer of ESBL-/PAmpC-Producing Enterobacteriaceae between Humans and Dogs – a Pilot Study.” *Infection Ecology & Epidemiology* 6(1):31514.
- López-Velandia, D. P., M. I. Torres-Caycedo, and C. F. Prada-Quiroga. 2015. “Genes de Resistencia En Bacilos Gram Negativos: Impacto En La Salud Pública En Colombia Resistance Genes in Gram Negative Bacilli: Impact on Public Health in Colombia.” *Revista Universidades y Salud* 18(1):190–202.
- Malloy, Allison M. W. and Joseph M. Campos. 2011. “Extended-Spectrum Beta-Lactamases.” *The Pediatric Infectious Disease Journal* 30(12):1092–93.
- Martínez, G. 2016. “Una Pieza Clave En La Evolución.” 1:1–12.
- Martinez, Jose Luis. 2009. “Environmental Pollution by Antibiotics and by Antibiotic Resistance Determinants.” *Environmental Pollution* 157(11):2893–2902.
- Medina Morales, Diego Alejandro, Manuel Enrique Machado Duque, and Jorge Machado Alba. 2015. “Resistencia a Antibióticos, Una Crisis Global.” *Revista Médica de Risaralda*, 74–74.
- Melo, Luana C., Cíntia Oresco, Lucianne Leigue, Hildebrando M. Netto, Priscilla A. Melville, Nilson R. Benites, Estelle Saras, Marisa Haenni, Nilton Lincopan, and Jean Yves Madec. 2018. “Prevalence and Molecular Features of ESBL/PAmpC-Producing Enterobacteriaceae in Healthy and Diseased Companion Animals in Brazil.” *Veterinary Microbiology* 221:59–66.
- Ministerio de Salud. 2018. “Plan Nacional de Acción Contra La Resistencia Antimicrobiana.”
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador. 2019. “Plan Nacional Para La Prevención y Control de La Resistencia Antimicrobiana.” *Viceministerio de Gobernanza y Vigilancia de La Salud* 38.
- Miranda García, M^a C. 2013. “Escherichia Coli Portador de Betalactamasas de Espectro Extendido: Resistencia.” *Sanidad Militar* 69(4):244–48.
- Mohapatra, Bidyut R., Klaas Broersma, and Asit Mazumder. 2007. “Comparison of

- Five Rep-PCR Genomic Fingerprinting Methods for Differentiation of Fecal Escherichia Coli from Humans, Poultry and Wild Birds.” *FEMS Microbiology Letters* 277(1):98–106.
- Nagel, Rosa. 2000. “La Resistencia de Las Bacterias a Los Antibióticos. ¿Un Camino Sin Retorno?” *Ciencia Hoy*.
- Nägele, Viola. 2019. “EL VÍNCULO HUMANO-ANIMAL ENTRE LAS PERSONAS SIN HOGAR Y SUS MASCOTAS.”
- Nair, Divek V. T., Kumar Venkitanarayanan, and Anup Kollanoor Johny. 2018. “Antibiotic-Resistant Salmonella in the Food Supply and the Potential Role of Antibiotic Alternatives for Control.” *Foods* 7(10).
- Nilsson, Oskar. 2015. “Hygiene Quality and Presence of ESBL-Producing Escherichia Coli in Raw Food Diets for Dogs .” *Infection Ecology & Epidemiology* 5(1):28758.
- Oliver, Antonio and Rafael Cantón. 1990. “Enterobacterias Productoras De B-Lactamasas Plasmídicas De Espectro Extendido.” *Control de Calidad SEIMC* 1–10.
- OMS. 2019. “Llamamiento a La Participación En El Sistema Mundial de Vigilancia de La Resistencia a Los Antimicrobianos.” *Organización Mundial de La Salud*. Retrieved December 17, 2019 (<https://www.who.int/drugresistance/surveillance/es/>).
- Ortega-Paredes, David, Marco Haro, Paula Leoro-Garzón, Pedro Barba, Karen Loaiza, Francisco Mora, Martha Fors, Christian Vinueza-Burgos, and Esteban Fernández-Moreira. 2019. “Multidrug-Resistant Escherichia Coli Isolated from Canine Faeces in a Public Park in Quito, Ecuador.” *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 18:263–68.
- Pagani, Laura, Roberta Migliavacca, Ernesto Giacobone, Gianfranco Amicosante, Egidio Romero, and Gian Maria Rossolini. 2003. “Multiple CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases in Nosocomial Isolates Of.” *Society* 41(9):4264–69.

- Pantozzi, F. L., F. A. Moredo, G. B. Vigo, and G. I. Giacoboni. 2010. "Resistencia a Los Antimicrobianos En Bacterias Indicadoras y Zoonóticas Aisladas de Animales Domésticos En Argentina." *Revista Argentina de Microbiología* 42(1):49–52.
- Pick, James B. and Rasool Azari. 2008. "Global Digital Divide: Influence of Socioeconomic, Governmental, and Accessibility Factors on Information Technology." *Information Technology for Development*.
- Pujol, Miquel and Carmen Peña. 2003. "El Significado Clínico de Las Betalactamasas de Espectro Extendido." *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 21(2):69–71.
- Van Puyvelde, Sandra, Stijn Deborggraeve, and Jan Jacobs. 2018. "Why the Antibiotic Resistance Crisis Requires a One Health Approach." *The Lancet. Infectious Diseases* 18(2):132–34.
- Restrepo Salazar, Juan Gonzalo. 2013. *Terapéutica Veterinaria 2013-2015*. 4 ed. Medellín: CBI.
- Rocha-Gracia, R. C., G. Cortés-Cortés, P. Lozano-Zarain, F. Bello, Y. Martínez-Laguna, and C. Torres. 2015. "Faecal Escherichia Coli Isolates from Healthy Dogs Harbour CTX-M-15 and CMY-2 β -Lactamases." *Veterinary Journal* 203(3):315–19.
- Rubin, Joseph E. and Johann D. D. Pitout. 2014. "Extended-Spectrum β -Lactamase, Carbapenemase and AmpC Producing Enterobacteriaceae in Companion Animals." *Veterinary Microbiology* 170(1–2):10–18.
- Sallem, Rym Ben, Haythem Gharsa, Karim Ben Slama, Beatriz Rojo-Bezares, Vanesa Estepa, Nerea Porres-Osante, Ahlem Jouini, Naouel Klibi, Yolanda Sáenz, Abdellatif Boudabous, and Carmen Torres. 2013. "First Detection of CTX-M-1, CMY-2, and QnrB19 Resistance Mechanisms in Fecal *Escherichia Coli* Isolates from Healthy Pets in Tunisia." *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 13(2):98–102.
- Salud, Ministerio de. 2014. "Lineamientos Técnicos Para La Prevención, Vigilancia y Contención de Resistencia Bacteriana a Los Antimicrobianos." *Ministerio de*

Salud El Salvador 21.

- Sánchez, María, Norma Gutiérrez, Mónica Padilla, and Leidy Suárez. 2015. “Resistencia Antimicrobiana de Bacterias Aisladas de Clínicas Veterinarias de La Ciudad de Ibagué, Colombia.” *Universidad y Salud* 17(1):18–31.
- Sarmah, Ajit K., Michael T. Meyer, and Alistair B. A. Boxall. 2006. “A Global Perspective on the Use, Sales, Exposure Pathways, Occurrence, Fate and Effects of Veterinary Antibiotics (VAs) in the Environment.” *Chemosphere* 65(5):725–59.
- Saunders, Jessica, Layla Parast, Susan H. Babey, and Jeremy V Miles. 2017. “Exploring the Differences between Pet and Non-Pet Owners : Implications for Human- Animal Interaction Research and Policy.” 1–15.
- Shaheen, Bashar W., Rajesh Nayak, Steven L. Foley, Ohgew Kweon, Joanna Deck, Miseon Park, Fatemeh Rafii, and Dawn M. Boothe. 2011. “Molecular Characterization of Resistance to Extended-Spectrum Cephalosporins in Clinical Escherichia Coli Isolates from Companion Animals in the United States.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55(12):5666–75.
- Sidjabat, Hanna E., Nancy D. Hanson, Ellen Smith-Moland, Jan M. Bell, Justine S. Gibson, Lucio J. Filippich, and Darren J. Trott. 2007. “Identification of Plasmid-Mediated Extended-Spectrum and AmpC β -Lactamases in Enterobacter Spp. Isolated from Dogs.” *Journal of Medical Microbiology* 56(3):426–34.
- Da Silva Franco, Andreia. 2017. “Infección Del Tracto Urinario Por Escherichia Coli En Perros y Gatos: Mecanismos Moleculares de Resistencia a Betalactámicos.” Universidad de Lisboa.
- Suárez, Cristina and Francesc Gudiol. 2009. “Antibióticos Betalactámicos.” *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 27(2):116–29.
- Sun, Jian, Ximin Zeng, Xing Ping Li, Xiao Ping Liao, Ya Hong Liu, and Jun Lin. 2017. “Plasmid-Mediated Colistin Resistance in Animals: Current Status and Future Directions.” *Animal Health Research Reviews* 18(2):136–52.

- Sun, Y., Z. Zeng, S. Chen, J. Ma, L. He, Y. Liu, Y. Deng, T. Lei, J. Zhao, and J. H. Liu. 2010. "High Prevalence of BlaCTX-M Extended-Spectrum β -Lactamase Genes in Escherichia Coli Isolates from Pets and Emergence of CTX-M-64 in China." *Clinical Microbiology and Infection* 16(9):1475–81.
- Tenaillon, Olivier, David Skurnik, Bertrand Picard, and Erick Denamur. 2010. "The Population Genetics of Commensal Escherichia Coli." *Nature Reviews Microbiology* 8(3):207–17.
- Tenover, Fred C. 2006. "Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria." *American Journal of Medicine* 119(6 SUPPL. 1).
- Villacís, José Eduardo. 2017. "Sistema Nacional Vigilancia RAM Ecuador."
- Vivanco, Mónica. 2016. "Incidencia Del Uso de Antimicrobianos En La Producción de Alimentos Para El Consumo Humano." 66.
- De Vuyst, Luc, Nicholas Camu, Tom De Winter, Katrien Vandemeulebroecke, Vincent Van de Perre, Marc Vancanneyt, Paul De Vos, and Ilse Cleenwerck. 2008. "Validation of the (GTG)₅-Rep-PCR Fingerprinting Technique for Rapid Classification and Identification of Acetic Acid Bacteria, with a Focus on Isolates from Ghanaian Fermented Cocoa Beans." *International Journal of Food Microbiology* 125(1):79–90.
- Wedley, Amy L., Susan Dawson, Thomas W. Maddox, Karen P. Coyne, Gina L. Pinchbeck, Peter Clegg, Tim Nuttall, Miranda Kirchner, and Nicola J. Williams. 2017. "Carriage of Antimicrobial Resistant Escherichia Coli in Dogs: Prevalence, Associated Risk Factors and Molecular Characteristics." *Veterinary Microbiology* 199:23–30.
- WHO. 2017. *Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) Report Early Implementation*.
- World Health Organization. 2018. "OMS | Datos Recientes Revelan Los Altos Niveles de Resistencia a Los Antibióticos En Todo El Mundo." *WHO*.
- Xu, Jian, Yan Xu, Hongmei Wang, Changsheng Guo, Huiyun Qiu, Yan He, Yuan Zhang, Xiaochen Li, and Wei Meng. 2015. "Occurrence of Antibiotics and

Antibiotic Resistance Genes in a Sewage Treatment Plant and Its Effluent-Receiving River.” *Chemosphere* 119:1379–85.

Yañez Muñoz, Diego Alberto. 2011. “BACTERIAS DESCRITAS COMO NOSOCOMIALES DETECCIÓN OF Bla TEM RESISTANCE GENE IN BACTERIA DESCRIBED AS NOSOCOMIAL BACTERIAS DESCRITAS COMO NOSOCOMIALES DETECCIÓN OF Bla TEM RESISTANCE GENE IN BACTERIA DESCRIBED AS NOSOCOMIAL.” UNIVERSIDAD DE CHILE.

Zogg, Anna Lena, Sabrina Simmen, Katrin Zurfluh, Roger Stephan, Sarah N. Schmitt, Guadalupe Virginia Nevárez-, and Magdalena Nüesch-inderbinen. 2018. “High Prevalence of Extended-Spectrum β -Lactamase Producing Enterobacteriaceae Among Clinical Isolates From Cats and Dogs Admitted to a Veterinary Hospital in Switzerland.” 5(March):1–8.

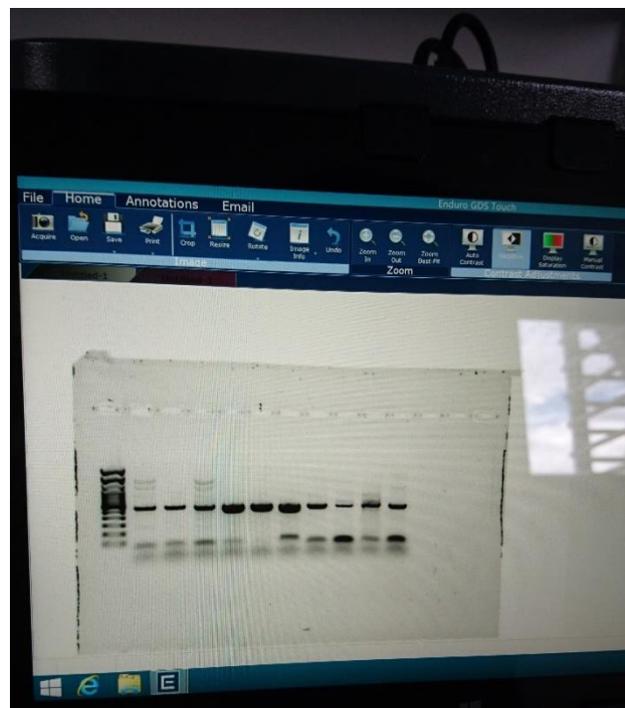
4.3 ANEXOS

4.3.1 ANEXO A

Fotografías



Foto 1. Generación de biomasa *over night*.



Fotos 2, 3. Visualización de geles de agarosa en el transiluminador.

4.3.2 ANEXO B

Identificación de la presencia de genes *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M y *bla*CMY de resistencia a betalactámicos en aislados de *E. coli*.

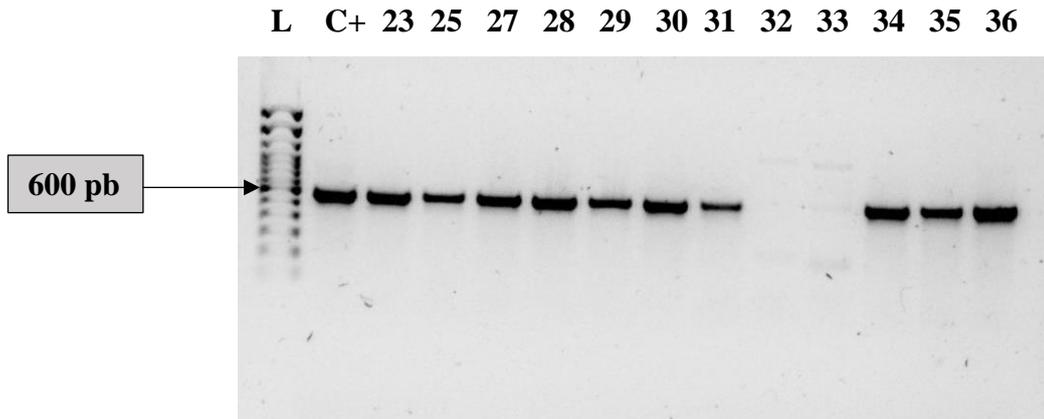


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa
Muestras positivas para *bla*CTX-M

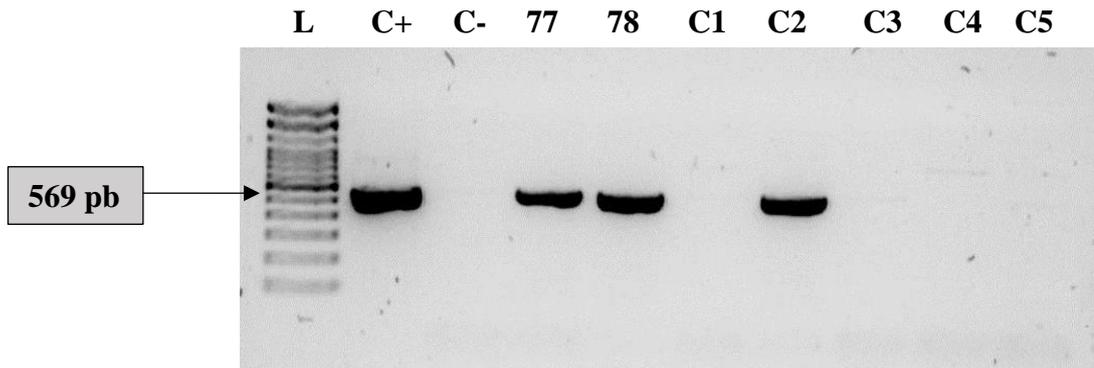


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa
Muestras positivas para *bla*TEM

Identificación de la presencia de genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} y *bla*_{CMY} de resistencia a betalactámicos en aislados de *E. coli*.

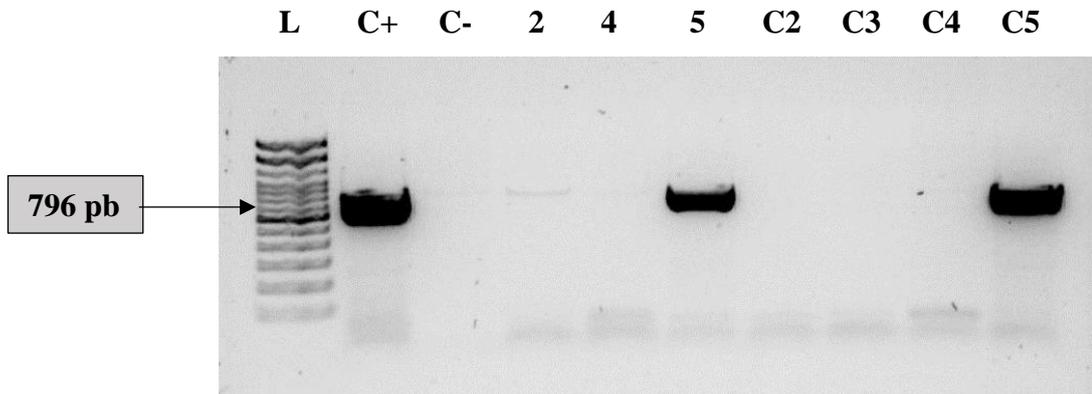


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa

Muestras positivas para *bla*_{SHV}

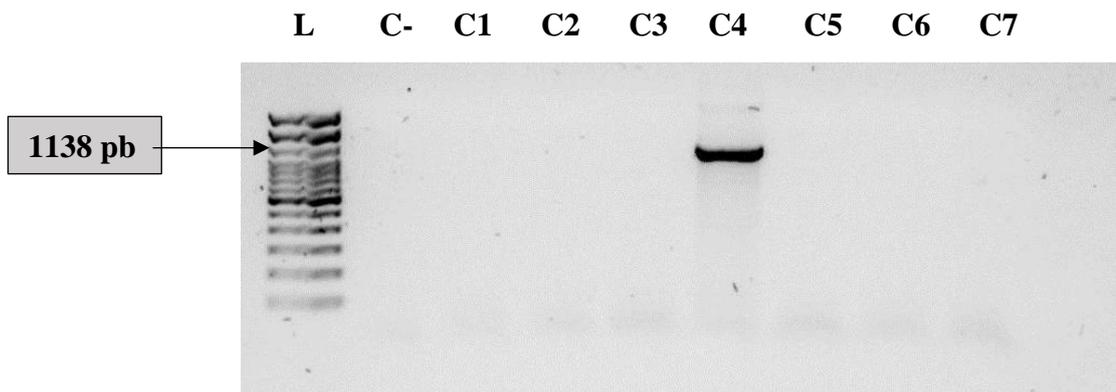


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa

Muestras positivas para *bla*_{CMY}

4.3.3 ANEXO C

Ensayo con el marcador molecular (GTG)5 para la e valuación de la diversidad clonal de los genes de resistencia a betalactámicos en aislados de *E. coli*.

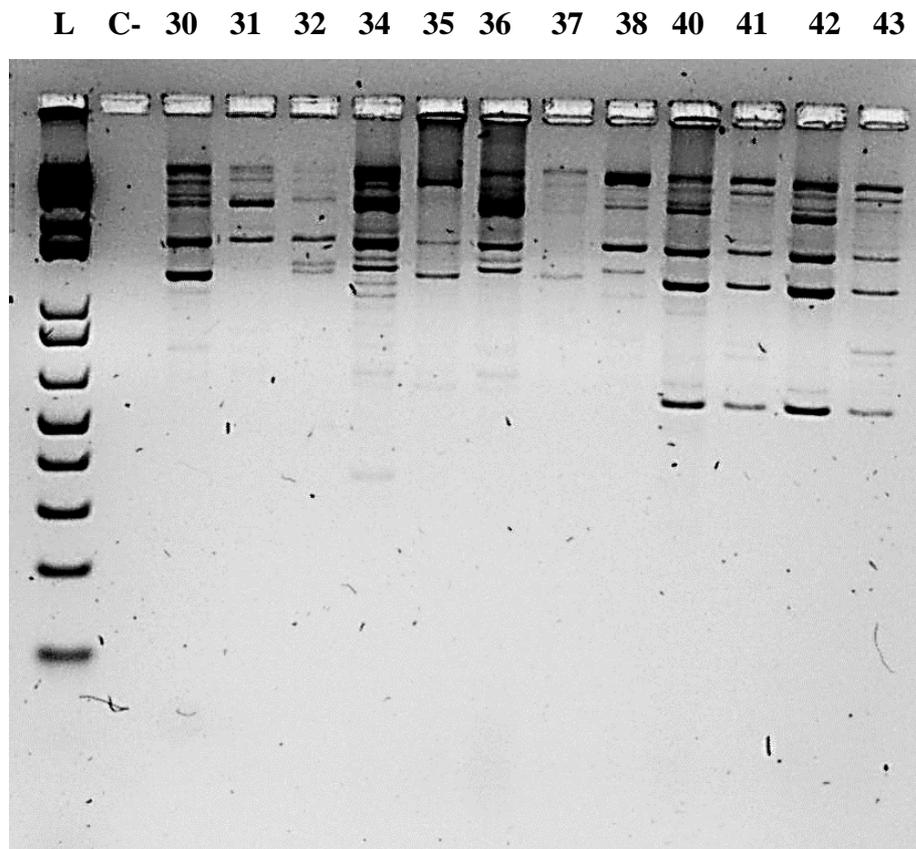


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa para la evaluación de la diversidad clonal. Marcador molecular (GTG)₅.

4.3.4 ANEXO D

Detalle de los patrones fenotípicos y genotípicos de los aislados de E. coli provenientes de caninos de la ciudad de Ambato

#	MUESTRA ID	ORIGEN	BLEE	AMPC	bla TEM	bla CTXM	bla SHV	bla CMY	EDAD	RAZA	SEXO	ANAMNESIS
56	CVSP 100a	Doméstico CVSP	NO	TZP, IPM	+	+	-	-	10 años	Poodle	H	NPL
5	CVSP 12a	Doméstico CVSP	SI	SI	+	+	+	-	9 años	Doberman Pinscher	M	S
37	C18a	Callejero	SI	SI	-	+	-	-	2 años	Mestizo	H	S
77	C14b	Callejero	SI	SI	+	+	-	-	3 años	Mestizo	M	S
11	C14a	Callejero	AMC, FEP, CAZ	SI	+	+	-	-	3 años	Mestizo	M	S
6	CVSP 15Sa	Doméstico CVSP	AMC, FEP, CAZ	SI	+	+	-	-	4 meses	Pitbull	M	S
10	C2a	Callejero	AMC, FEP	TZP, IPM	+	+	-	-	2 años	Mestizo	M	HAB
70	CVSP 73b	Doméstico CVSP	SI	SI	-	+	-	-	10 años	Poodle	H	OSA
9	CVSP 26Sa	Doméstico CVSP	SI	SI	+	+	-	-	2 años	Pastor Alemán	H	S
4	CVSP 08a	Doméstico CVSP	NO	TZP, IPM	+	+	-	-	2 años	Shitzu	H	GTX
61	C19b	Callejero	SI	SI	-	+	-	-	2 años	Mestizo	H	S
31	CVSP 62a	Doméstico CVSP	AMC, CAZ	NO	+	+	-	-	4 meses	Pekinés	H	S
25	C19a	Callejero	SI	SI	+	+	-	-	2 años	Mestizo	H	S
73	CVSP 62b	Doméstico CVSP	SI	SI	+	+	-	-	4 meses	Pekinés	H	S
78	CVSP47E2	Doméstico CVSP	SI	SI	+	+	+	-	9 años	Poodle	M	GTX
57	CVSP 17Sb	Doméstico CVSP	NO	TZP, CAZ	+	+	-	-	1 año	Shitzu	M	S
53	CVSP 94	Doméstico CVSP	SI	TZP, IMP	+	+	-	-	3 años	Pitbull	H	GES
50	CVSP 85	Doméstico CVSP	SI	SI	+	+	-	-	3 años	Teckel	M	PTM
49	CVSP 84	Doméstico CVSP	SI	NO	+	+	-	-	4 meses	Mestizo	M	S
63	C17b	Callejero	SI	SI	-	+	-	-	8 meses	Pitbull	M	VIN
45	CVPP 08	Doméstico CVPP	NO	TZP, CAZ	-	+	-	-	14 años	Golden retriever	M	NEU
65	C36	Callejero HDV	NO	TZP, IMP	+	-	-	+	4 años	Poodle	M	S

#	MUESTRA ID	ORIGEN	BLEE	AMPC	bla TEM	bla CTXM	bla SHV	bla CMY	EDAD	RAZA	SEXO	ANAMNESIS
62	C29b	Callejero	SI	SI	-	+	-	-	7 años	Mestizo	H	S
72	CVSP 57b	Doméstico CVSP	SI	SI	+	+	-	-	3 años	Mestizo	M	TBR
66	C37	Callejero HDV	SI	SI	-	-	-	+	5 años	Mestizo	M	S
58	C2c	Callejero	AMZ, CAZ	TZP, IMP	-	+	-	-	2 años	Mestizo	M	HAB
61	C19b	Callejero	SI	SI	-	+	-	-	2 años	Mestizo	H	S
60	CVSP 60b	Doméstico CVSP	SI	SI	+	+	-	-	2 años	Mestizo	H	S
59	CVSP 99	Doméstico CVSP	SI	SI	-	+	-	-	2 meses	Bull Terrier	M	GTX
60	CVSP 60b	Doméstico CVSP	SI	SI	+	+	-	-	2 años	Mestizo	H	S
58	C2c	Callejero	AMZ, CAZ	TZP, IMP	-	+	-	-	2 años	Mestizo	M	HAB
38	CVSP 79a	Doméstico CVSP	AMC, CAZ	SI	-	+	-	-	4 meses	Mestizo	H	S
66	C37	Callejero HDV	SI	SI	-	-	-	+	5 años	Mestizo	M	S
16	CVSP 43S1	Doméstico CVSP	SI	TZP, IMP	+	+	-	-	2 meses	Poodle	H	S
41	CVPP 04a	Doméstico CVPP	NO	TZP, CAZ	-	+	-	-	8 años	Mestizo	H	DER
20	C17a	Callejero	AMC, FEP, CAZ	TZP, IPM	+	+	-	-	8 meses	Poodle	M	VIN
15	CVSP 39S	Doméstico CVSP	AMC, CAZ	SI	+	+	-	-	2 años	Poodle	H	S
17	CVSP 45E1a	Doméstico CVSP	NO	TZP, CAZ	+	+	-	-	1 mes	Sharpei	M	PVS
14	CVSP 37E1	Doméstico CVSP	AMC, FEP, CAZ	SI	+	+	-	-	3 meses	Pitbull	M	GTX
19	CVSP 48E1	Doméstico CVSP	NO	TZP, CAZ	+	+	-	-	12 años	Poodle	M	TBR
13	CVSP 35E1	Doméstico CVSP	AMC, FEP	SI	+	+	-	-	1 mes	Shitzu	M	GTX
28	C30a	Callejero	SI	TPZ, IMP	+	+	-	-	9 años	Mestizo	H	S
74	C2b	Callejero	SI	SI	-	+	-	-	2 años	Mestizo	M	HAB
76	CVSP 45E2	Doméstico CVSP	SI	SI	-	+	-	-	1 mes	Sharpei	M	PVS
52	CVSP 93	Doméstico CVSP	SI	TZP, IMP	+	+	-	+	2 meses	Poodle	M	GTX
51	CVSP 89	Doméstico CVSP	SI	NO	-	-	-	-	1 año	Bóxer	H	GTX
19	CVSP 48E1	Doméstico CVSP	NO	TZP, CAZ	+	+	-	-	12 años	Poodle	M	TBR

#	MUESTRA ID	ORIGEN	BLEE	AMPC	bla TEM	bla CTXM	bla SHV	bla CMY	EDAD	RAZA	SEXO	ANAMNESIS
18	CVSP 47E1	Doméstico CVSP	SI	TZP, IMP	+	+	-	-	9 años	Poodle	M	GTX
47	CVSP 83a	Doméstico CVSP	NO	TZP, CAZ	+	+	-	-	10 años	Poodle	M	TBR
8	CVSP 18Ea	Doméstico CVSP	AMC, FEP, CAZ	SI	-	+	-	-	2 años	Bulldog Inglés	M	GTX
7	CVSP 17Sa	Doméstico CVSP	AMC, FEP, CRO	TODAS	+	+	-	-	1 año	Shitzu	M	S
36	CVSP 77a	Doméstico CVSP	AMC, CAZ	SI	+	+	-	-	8 años	Mestizo	M	S
35	CVSP 76a	Doméstico CVSP	SI	SI	-	+	-	-	2 años	Yorkshire	H	S
32	CVSP 68a	Doméstico CVSP	AMC, FAP	NO	+	-	+	-	15 años	Poodle	M	ORQ
64	C30b	Callejero	SI	SI	-	+	-	-	9 años	Mestizo	H	S
43	CVPP 06	Doméstico CVPP	SI	SI	+	+	-	-	3 años	Mestizo	H	S
42	CVPP 05a	Doméstico CVPP	SI	NO	+	+	-	-	6 meses	Cocker spaniel	H	DIS
40	CVPP 03a	Doméstico CVPP	NO	SI	+	+	-	-	3 meses	Poodle	H	S
75	CVSP45E1	Doméstico CVSP	SI	SI	+	+	-	-	1 mes	Sharpei	M	PVS
69	C18b	Callejero	SI	SI	+	+	-	-	2 años	Mestizo	H	S
46	CVSP 81a	Doméstico CVSP	SI	TZP, IMP	-	+	-	-	3 meses	Pitbull	M	PVS
44	CVPP 07a1	Doméstico CVPP	SI	TZP, IMP	-	+	-	-	5 meses	Poodle	M	DIS
71	CVSP 68b	Doméstico CVSP	SI	SI	+	-	+	-	15 años	Poodle	M	ORQ
34	CVSP 73a	Doméstico CVSP	AMC, FEP, CAZ	TZP, IMP	-	+	-	-	10 años	Poodle	H	OSA
55	CVPP 12a	Doméstico CVPP	AMC, FEP	TZP, IMP	+	+	-	-	3 años	Schnautzer	M	ITX
30	CVSP 61a	Doméstico CVSP	SI	TZP, IMP	+	+	-	-	6 meses	Schnautzer	H	PVS
27	C29a	Callejero	AMC, CAZ	SI	+	+	-	-	7 años	Mestizo	H	S
2	CVSP 04a	Doméstico CVSP	NO	TZP, IMP	+	+	-	-	3 meses	Husky Siberiano	H	GTX

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