

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS VETERINARIAS



**“Detección fenotípica y genotípica de *Escherichia coli*
productoras de β -lactamasas espectro extendido aisladas
de aves de abasto en Perú”**

Nathaly Rossemery Peña Murillo

Tesis para optar el Título Profesional de Médica Veterinaria

Lima, Perú

2018

DEDICATORIA

A mis padres, quienes confiaron en mí y sacrificaron su vida para hacerme feliz, por ser fuente de inspiración para mi superación, todo mi amor les pertenece al igual que mis logros.

A la admirable naturaleza entera, a quien le debo respeto, y con su misterio permite ampliar mis conocimientos proporcionándome el germen de la ciencia.

AGRADECIMIENTO

A Dios, quien me ha regalado una vida llena de milagros y además me guía con todo su amor.

A mi familia, especialmente a mis padres Jorge y María por su gran esfuerzo y apoyo incondicional que me han brindado desde siempre, los amo.

A los docentes de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria de la Universidad Ricardo Palma, por las experiencias y enseñanzas compartidas en mi formación etapa de pregrado.

A la empresa privada Bioservice S.R.L. especialmente al gerente general Doctor Robert Tinoco, que me brindo el apoyo y las facilidades para iniciar y ejecutar el presente estudio.

En memoria del M.V. Arnaldo Alvarado Sánchez, le doy gracias por su persuasión, confianza y apoyo incondicional durante la realización de mi tesis.

A mi Director de tesis M.V. Franco Ceino Gordillo y asesor externo M.V. Jorge Rodríguez Bailón, quienes me orientaron al desarrollar la presente investigación y concluir satisfactoriamente.

A los M.V. María Sialer García, M.V. Daniel Fernández Tuesta, M.V. Guillermo Leguía Puente; miembros de mi jurado calificador, gracias por sus exigencias, sugerencias y recomendaciones.

M.V. Stephane Lovon, Lic. T.M. Richard Quispe Pedraza, Lic. Biól. Giuliana Donaire Tataje, M.V. Ofelia Alzamora Pinao, Bach. Biól. Ana María Agapito, gracias por sus consejos y conocimiento transmitido durante la realización de mi tesis.

A todos mis amigos y compañeros de estudio, gracias por su apoyo.

ÍNDICE

ÍNDICE	4
ÍNDICE DE TABLAS.....	6
ÍNDICE DE FIGURAS Y FOTOGRAFÍAS.....	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
I. INTRODUCCIÓN	10
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
III. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	15
IV. OBJETIVOS	16
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	16
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
V. MARCO TEÓRICO	17
5.1 BACTERIA <i>ESCHERICHIA COLI</i>	17
5.2. <i>ESCHERICHIA COLI</i> EN AVES.....	17
5.3. RESPUESTA BACTERIANA FRENTE AL ANTIBIÓTICO.....	18
5.4. DEFENSA DE <i>ESCHERICHIA COLI</i>	19
5.5. INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA POR B-LACTAMASAS.....	20
5.6. B-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE)	21
5.7. DETECCIÓN FENOTÍPICA CONFIRMATORIO PARA LA PRESENCIA DE B-LACTAMASAS ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE)	22
5.8. DETECCIÓN GENOTÍPICA DE LA PRESENCIA DE B-LACTAMASAS ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE)	23
VI. ANTECEDENTES.....	24
VII. HIPÓTESIS	30
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
8.1. LUGAR DE EJECUCIÓN.....	31
8.2. DISEÑO DE ESTUDIO.....	31
8.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	31
8.4. MUESTREO:.....	31
8.5. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.....	32
8.6. PROCEDIMIENTO PARA LA RECOLECCIÓN DE LOS DATOS.....	33

8.7 METODOLOGÍA.....	33
8.7.1. Aislamiento microbiológico de <i>Escherichia coli</i>	34
8.7.2. Viabilidad de cepas y recolección de datos.....	35
8.7.3. Detección fenotípica confirmatoria de enzimas β -lactamasas de espectro expandido (BLEE).....	35
8.7.4. Caracterización de genes que codifican β -lactamasas.....	36
IX. ASPECTO ÉTICO.....	38
X. RESULTADOS.....	39
XI. DISCUSIÓN.....	46
XII. CONCLUSIONES.....	51
XIII. RECOMENDACIONES.....	52
XIV. REFERENCIAS CITADAS.....	53
XV. PARTE COMPLEMENTARIA.....	60
15.1 CRONOGRAMA.....	60
15.2. SECUENCIA DE ACTIVIDADES:.....	60
15.3. PRESUPUESTO.....	61
15.3.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPA – FENOTÍPICA.....	61
15.3.2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPA – GENOTÍPICA.....	61
15.3.3. CUADRO RESUMEN DE PRESUPUESTO Y FINANCIAMIENTO.....	64
XVI. ANEXOS.....	65
XVII. GRÁFICOS.....	70
XVIII. FOTOGRAFÍAS:.....	74
XIX. RESULTADO DE PCR.....	78
XX. DOCUMENTOS.....	80

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. COMPOSICIÓN DEL MASTER MIX PARA CADA UNO DE LOS GENES (1 RX)	37
TABLA 2. CEBADORES Y CONDICIONES DE PCR MÉTODO CONVENCIONAL.....	37
TABLA 3. UBICACIÓN POR DEPARTAMENTO DE LAS 26 EMPRESAS CON SUS RESPECTIVAS SUCURSALES.	39
TABLA 4. ANTIBIOGRAMA DEL TOTAL DE LAS CEPAS DE <i>E. COLI</i> VIABLES INGRESADAS AL LABORATORIO ENTRE 2015 Y 2016.	40
TABLA 5. ANTIBIOGRAMA DEL TOTAL DE LAS CEPAS DE <i>E. COLI</i> INGRESADAS AL LABORATORIO ENTRE 2015 Y 2016.....	41
TABLA 6. DETECCIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE PRODUCCIÓN DE ENZIMAS BLEE EN EL TOTAL DE LAS CEPAS VIABLES DE <i>ESCHERICHIA COLI</i>	41
TABLA 7. FORMACIÓN DE LA IMAGEN QUE CONFIRMA FENOTÍPICAMENTE LA PRESENCIA DE ENZIMAS BLEE EN LOS AISLAMIENTOS...	42
TABLA 8. FRECUENCIA DE ÓRGANOS DE NECROPSIA QUE PRESENTARON ENZIMAS B-LACTAMASAS ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) SEGÚN EL MÉTODO FENOTÍPICO CONFIRMATORIO.	43
TABLA 9. PRESENCIA DE CEPAS PRODUCTORAS DE ENZIMAS BLEE CONFIRMADAS FENOTÍPICAMENTE, SEGÚN EL DEPARTAMENTO DE PROCEDENCIA.	44
TABLA 10. AISLAMIENTO DE <i>E. COLI</i> QUE EXPRESÓ ALGÚN GEN <i>BLA</i> POR PCR.....	44
TABLA 11. PRESENCIA DE RESISTENCIA FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA EN LAS CEPAS DE <i>E. COLI</i>	45

ÍNDICE DE FIGURAS Y FOTOGRAFÍAS

GRÁFICO 1: IDENTIFICACIÓN DE PROBLEMAS PARA LA PRESENTACIÓN DE ENZIMAS B-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE)	14
GRÁFICO 2. AISLAMIENTOS DE <i>E. COLI</i> PROCEDENTES DE LAS EMPRESAS Y SUCURSALES UBICADAS EN LOS DISTINTOS DEPARTAMENTOS ENTRE NOVIEMBRE DEL 2015 HASTA NOVIEMBRE DEL 2016	70
GRÁFICO 3. HALLAZGOS PORCENTUALES DEL ANTIBIOGRAMA REALIZADO A LOS AISLAMIENTOS DE <i>E. COLI</i> EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE LA EMPRESA BIOSERVICE S.R.L ENTRE NOVIEMBRE DEL 2015 Y NOVIEMBRE DEL 2016	70
GRÁFICO 4: ÓRGANOS DE NECROPSIA ANALIZADOS QUE PRESENTARON B-LACTAMASAS ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) SEGÚN EL MÉTODO FENOTÍPICO CONFIRMATORIO	71
GRÁFICO 5. PROCEDENCIA DE AISLAMIENTOS CON CEPAS BLEE POSITIVAS SEGÚN EL MÉTODO FENOTÍPICO CONFIRMATORIO	71
GRÁFICO 6. GENES <i>BLA</i> OBTENIDOS DE LOS AISLAMIENTOS BLEE POSITIVOS SEGÚN EL MÉTODO FENOTÍPICO CONFIRMATORIO, POR CADA EMPRESA Y SUCURSALES PROCEDENTE DE LOS DISTINTOS DEPARTAMENTOS	72
GRÁFICO 7. GENES <i>BLA</i> AMPLIFICADOS DE LOS AISLAMIENTOS BLEE POSITIVOS, SEGÚN EL MÉTODO FENOTÍPICO CONFIRMATORIO, DIVIDIDO POR CANTIDAD DE CEPAS HALLADAS POR CADA ÓRGANO ANALIZADO	72
GRÁFICO 8. HALLAZGOS PORCENTUALES DE LOS AISLAMIENTOS BLEE POSITIVOS POR CATEGORÍAS DEL ANTIBIOGRAMA	73
GRÁFICO 9:	73
FOTOGRAFÍA 1: FICHAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS EN EL LABORATORIO BIOSERVICE S.R.L. ENTRE EL AÑO 2015 Y 2016	74
FOTOGRAFÍA 2. DETECCIÓN FENOTÍPICA DE ENZIMAS B-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) SE REALIZÓ POR EL MÉTODO CONFIRMATORIO DE SINERGIA DE DOBLE DISCO SEGÚN EL COMITÉ DE ANTIBIOGRAMA DE LA SOCIEDAD FRANCESA DE MICROBIOLOGÍA, SE EVIDENCIA POR EFECTO SINÉRGICO ENTRE EL INHIBIDOR Y LOS DISCOS, SE PRESENTA LA FORMACIÓN DE LA IMAGEN EFECTO DE HUEVO, COLA DE PEZ O BALÓN DE FUTBOL AMERICANO.	74
FOTOGRAFÍA 3. (1) PROCEDIMIENTO DE NECROPSIAS Y TOMA DE MUESTRAS (2) EXAMEN MACROSCÓPICO DE ÓRGANOS	75
FOTOGRAFÍA 4. (1) MATERIALES PARA LA PREPARACIÓN DE AGARES. (2) PREPARACIÓN DE AGARES EN CÁMARA DE FLUJO LAMINAR	75
FOTOGRAFÍA 5. (1) TURBIDEZ N.º 0,5 DE LA ESCALA DE MC FARLAND (2) MÉTODO DE SIEMBRA CON HISOPO (3) COLOCACIÓN DE LOS DISCOS ANTIBIÓTICOS.	76
FOTOGRAFÍA 7. (1) AUTOCLAVE (2) DESECHO DE RESIDUOS	77
FOTOGRAFÍA 8. EXTRACCIÓN DE ADN BACTERIANO UTILIZANDO GF-1 BACTERIAL DNA EXTRACTION KIT.	77
FIGURA 9. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE GEN <i>BLACTX-M-1</i> (BLEE)	78
FIGURA 10. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE GEN <i>BLASHV</i> (BLEE)	79

RESUMEN

La resistencia bacteriana frente a los antibióticos es un importante problema de salud pública, que afecta en ámbitos de medicina humana, veterinaria, seguridad alimentaria como ambiental en Perú.

Los objetivos de este trabajo han sido la detección fenotípica y genotípica de cepas *Escherichia coli* productoras de enzimas β -Lactamasas de espectro extendido (β LEE), aisladas en aves de abasto en un laboratorio privado ubicado en la ciudad de Lima, Perú.

Se evaluaron 185 aislamientos de *E. coli* procedentes de aves de 26 empresas de crianza intensiva ubicadas en Perú, a las cuales se realizaron necropsias durante el periodo comprendido entre noviembre del 2015 hasta noviembre del 2016.

Se detectó *E. coli* productoras de enzimas β -Lactamasas de espectro extendido (β LEE) fenotípicamente, de acuerdo al método confirmatorio de sinergia de doble disco según el Comité de Antibiograma de la sociedad Francesa de Microbiología (Método de Jarlier), mientras la caracterización genotípica se realizó por la amplificación de los genes *bla*CTX-M-1, *bla*TEM y *bla*SHV en PCR.

Los resultados reflejan un total de 185 aislamientos, se halló 38,4% de cepas con presencia de enzimas β LEE confirmadas fenotípicamente; asimismo se expresó genes a partir de ADN total por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) obteniendo 33,5% entre los genes *bla*TEM, *bla*SHV y *bla*CTX-M-1 y el 4,9% de cepas *E. coli* productoras de β LEE fenotípico, sin gen *bla* determinado.

En conclusión, la presencia de cepas *Escherichia coli* productoras de enzimas β -Lactamasas de espectro extendido (β LEE), es elevada, siendo el gen tipo *bla*CTX-M-1 el más frecuente, por lo tanto, es necesario que se aumenten las medidas de detección y control de origen de este microorganismo productor de estas enzimas, del mismo modo orientar la terapia antimicrobiana empírica.

Palabras claves: *β -Lactamasas de espectro extendido, resistencia bacteriana, E. coli*

ABSTRACT

Bacterial resistance to antibiotics is an important public health problem that affects human, veterinary, food and environmental security in Perú.

The objectives of this work have been the phenotypic and genotypic detection of *Escherichia coli* strains that produce extended spectrum β -lactamase enzymes (β LEE), isolated in poultry in a private laboratory located in the city of Lima, Peru.

A total of 185 isolates of *E. coli* from birds of 26 intensive breeding companies located in Peru were evaluated, to which necropsies were performed during the period from November 2015 to November 2016.

E. coli producing extended-spectrum β -lactamase enzymes (β LEE) were detected according to the double disc synergy confirmatory method according to the Antibiogram Committee of the French Society of Microbiology (Jarlier Method), while genotypic characterization was performed by the amplification of *bla*CTX-M-1, *bla*TEM and *bla*SHV genes in PCR.

The results reflect a total of 185 isolations, found 38.4% of strains with the presence of ESBL confirmed phenotypically; Likewise, genes were expressed from total DNA by polymerase chain reaction (PCR) obtaining 33.5% between the *bla*TEM, *bla*SHV and *bla*CTX-M-1 genes and 4.9% of *E. coli* strains producing β LEE phenotypic, no gene *bla* determined.

In conclusion, the presence of *Escherichia coli* strains that produce extended-spectrum β -lactamase enzymes (β LEE) is high, with the *bla*CTX-M-1 gene being the most frequent, therefore, it is necessary to increase detection and control measures. control of origin of this microorganism producing these enzymes, in the same way to guide the empirical antimicrobial therapy.

Keywords: Extended-spectrum β -lactamases, bacterial resistance, *E. coli*

I. INTRODUCCIÓN

En el Perú la proteína más consumida de origen animal, es la carne de aves (Contreras S. , 2016, pág. 7), en el año 2017 se consumió 42 kilos per cápita en promedio, esta cifra continúa aumentando año a año. (Vera, 2017) Por este motivo, se considera de alto riesgo en salud pública, la falta de datos actualizados respecto a la evaluación y seguimiento epidemiológico de posibles zoonosis.

La perpetuación de cepas resistentes a antibióticos en estas aves, se considera de alto riesgo, puesto que, en Perú, se expenden aditivos nutricionales en el alimento terminado de animales de consumo humano, como promotores de crecimiento (Montana, 2017); que con el uso indiscriminado se ha elevado la adaptación de los microorganismos con diferentes mecanismos de resistencia, entre ellos, en la familia *Enterobacteriaceae* el principal mecanismo de resistencia es la producción de β -lactamasas de espectro extendido (β LEE).

β LEE son enzimas capaces de conferir resistencia a penicilinas y cefalosporinas, incluyendo las de tercera y cuarta generación, pueden ser inhibidas por el ácido clavulánico u otros inhibidores de β -lactamasas como tazobactam y sulbactam, son sensibles frente a cefamicinas (cefoxitin, cefotetam), y carbapenemicos (imipenem, meropenem, ertapenem); frecuentemente asociadas a plásmidos conjugativos, lo cual facilita su diseminación entre distintos microorganismos de distintos géneros y grupos, confiriendo perfil de resistencia antibiótica múltiple. (Oliver & Cantón , 2004, pág. 1)

En el 2004 la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (IDSA) publicó que el descubrimiento de nuevos antibióticos, se ha estancado, y con ello una consecuente crisis de salud pública (Sociedad de las Enfermedades Infecciosas de América, 2010) (Freire, Moran, & et al, 2004); con este antecedente este tipo de súper bacterias, inmunes a los fármacos conocidos, gracias a mutaciones espontaneas, matarán a 10 millones de personas cada año a

partir de 2050, más que el cáncer (8,2 millones de fallecimientos) según el gobierno británico. (O'Neill, 2014, pág. 5)

La OMS anunció las 12 familias de bacterias más peligrosas para el ser humano, y clasificada como prioridad crítica se encuentra la familia *enterobacteriaceae* resistentes a los carbapenemicos y productores de β -lactamasas de espectro extendido (β LEE). (OMS, 2017)

Además, "La posibilidad de que la cadena alimentaria sea un vehículo importante de transferencia de genes de resistencia al hombre ha sido planteada por distintos autores" (Herrera, 2015, pág. 7) y se ha sugerido un origen alimentario a la presencia de cepas de *E. coli* portadoras de β LEE en la microbiota intestinal de humanos. (Marrero-Moreno, y otros, 2017, pág. 11)

También se ha planteado el posible origen animal de cepas multi-resistentes de *E. coli* implicadas en infecciones urinarias en clínica humana. (Torres & Zarazaga, β LEE en animales y su importancia en la transmisión a humanos, 2007, pág. 31)

Por lo tanto, teniendo en cuenta que en Perú, no hay estudios publicados de detección fenotípica y genotípica de *Escherichia coli* productoras de enzimas β -Lactamasas de espectro extendido en aves de consumo humano, limita la disponibilidad de datos necesarios para el control de la emergencia en mecanismos de resistencia desarrollados por bacterias presentes en estas aves; además, el planteamiento de que bacterias productoras de enzimas β -Lactamasas de espectro extendido podrían ser fuente de transmisión de estas enzimas al hombre, provee la importancia para detectar estas cepas de *E. coli* aisladas a partir de cuadros infecciosos ocurridos en 26 empresas tecnificadas que ingresaron a un laboratorio privado en Villa María del Triunfo entre noviembre del 2015 hasta noviembre del 2016, de este modo en estudios futuros, se logre iniciar el monitoreo epidemiológico de resistencia antibiótica y poder aislar los casos de portadores de cepas multidrogoresistentes

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el Perú, la proteína de origen animal más consumida es la carne de aves y el consumo aumenta año a año. (Contreras S. , 2016, pág. 7)

Este crecimiento favorece a que mayor cantidad de empresas se dediquen a la crianza intensiva de estos animales, y según la revista científica y técnica de la universidad de Murcia, España, indica que el mayor riesgo de excreción de agentes patógenos, post infección lo presentan aves cuyo sistema inmunitario se encuentra comprometido, como en las explotadas intensivamente con sistemas de producción forzada. (Contreras , y otros, 2016, pág. 4), obteniendo mayor cantidad de aves susceptibles a enfermedades; sin embargo, la OIE y el Farm Animal Welfare Council del Reino Unido en 1979 (FAWC, 1979), estableció que los animales de granja deben tener libertad de no sufrir dolor, heridas o enfermedades. (Janet Nicol & Davies, 2016, pág. 2), (Ley de protección y bienestar animal, 2016)

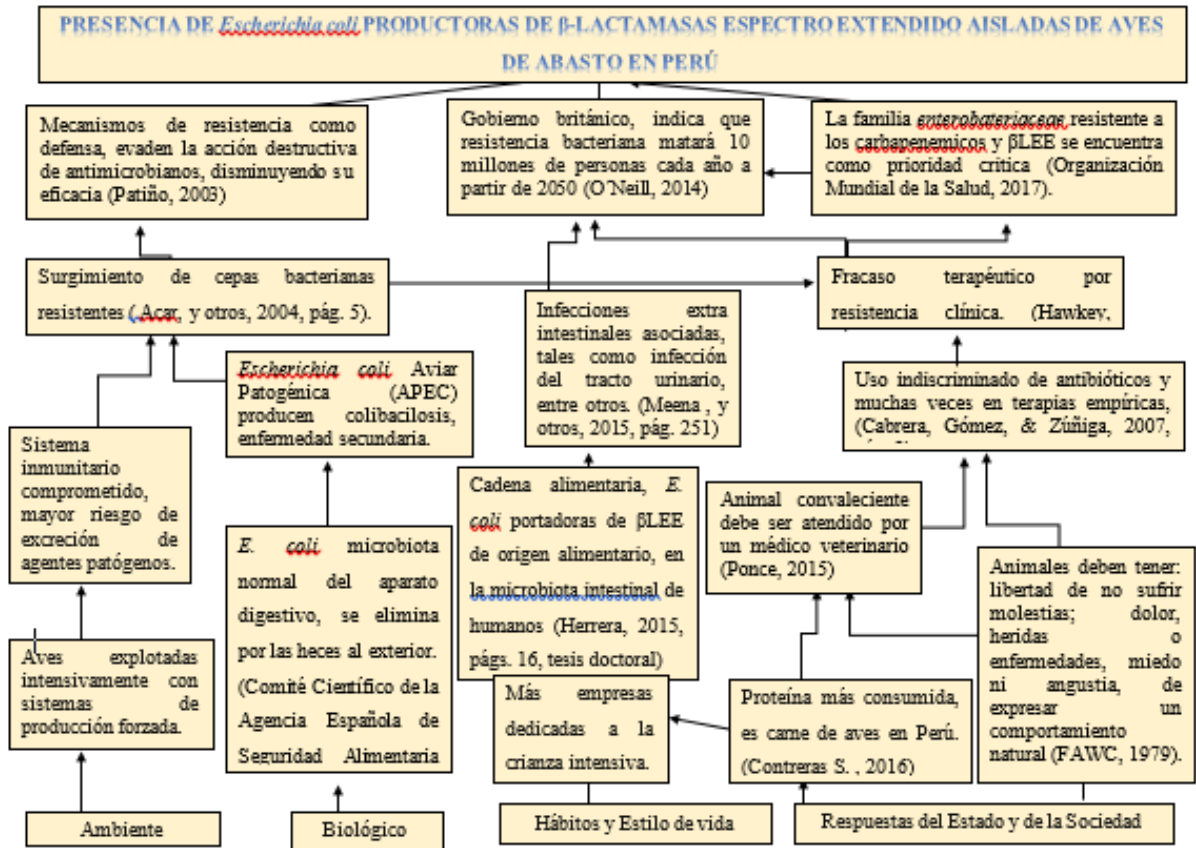
Un animal convaleciente debe ser atendido por un médico veterinario a la brevedad posible (Ponce del Valle, Vicari , Florencia Faravelli, Glauber, & Winter, 2015, pág. 25) pero, la explotación intensiva, sumada a la administración de antibióticos utilizados indiscriminadamente y muchas veces en terapias empíricas, (Cabrera, Gómez, & Zuñiga, 2007, pág. 3) sea como promotores de crecimiento o uso terapéutico, reducen considerablemente la eficiencia y eficacia de antibióticos muy importantes sobre las bacterias, y más importante, actualmente dichas bacterias se han adaptado, volviéndose muy peligrosas gracias a los mecanismos de resistencias desarrollados, siendo el aumento de la presencia de enzimas β -lactamasas de espectro extendido un problema crítico, que desencadenará factores muy perjudiciales y en corto tiempo para la salud humana.

Actualmente hay muchos datos publicados acerca de la presencia de enzimas β LEE en humanos, sin embargo, no existen publicaciones con referencia a microorganismos portadores de la misma resistencia antimicrobiana en aves en Perú, por ello es necesario detectar fenotípica y genotípicamente β LEE en animales, además cobraría relevancia el estudio de zoonosis, pero no será motivo de este estudio.

El presente trabajo será base para estudios futuros, por ejemplo, hallar nuevos métodos de neutralización de enzimas β -lactamasas de espectro extendido, estudiar la relación del consumo de alimentos con presencia de estas enzimas, plantear mejores controles sanitarios, concientizar sobre el uso de antimicrobianos, vigilancia epidemiológica y control de la emergencia.

Determinar, ¿Qué cepas de *Escherichia coli* aisladas de aves de 26 empresas tecnificadas que ingresaron a un laboratorio privado en Villa María del Triunfo entre los años 2015 - 2016 son productoras de enzimas β -lactamasas de espectro extendido (β LEE)? y ¿Qué genotipo presentan?

Gráfico 1: Identificación de problemas para la presentación de enzimas β -lactamasas de espectro extendido (β LE)



III. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La detección fenotípica y genotípica de la presencia de enzimas β LEE en cepas aisladas de animales de consumo humano, específicamente en aves, tomó importancia al ser la proteína de procedencia animal más consumida en Perú, de esta manera en futuros estudios, se podrá investigar sobre la interacción fenotípica como genética con la especie humana, con el fin de evaluar los perjuicios a futuro y realizar vigilancia epidemiológica y control.

También se identificó cepas *E. coli* multidrogaresistentes a antibióticos normalmente utilizados en la práctica veterinaria como en medicina humana.

El impacto sobre la salud pública, la importancia del control de densidad poblacional en animales de crianza intensiva, control del uso de antimicrobianos y zoonosis, no serían posibles sin estudios previos del hallazgo de estas enzimas en bacterias procedentes de animales que están en profunda relación y contacto con la humanidad.

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Detectar la frecuencia fenotípica y genotípica en cepas de *Escherichia coli* productoras de enzimas β -Lactamasas de espectro extendido (β LEE), aisladas de 26 empresas tecnificadas que ingresaron a un laboratorio privado en Villa María del Triunfo entre los años 2015 – 2016.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Detectar fenotípicamente la presencia de enzimas β -Lactamasas espectro extendido (β LEE), utilizando el método confirmatorio de sinergia de doble disco según el Comité de Antibiograma de la sociedad Francesa de Microbiología (Método de Jarlier).

Expresar genes a partir de ADN total por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando cebadores específicos para blaTEM, blaSHV y blaCTX-M-1

Determinar el perfil de sensibilidad/resistencia a antimicrobianos de uso protocolar como familias de β -lactámicos, tetraciclinas, fenicoles, ácido fosfónico, sulfa-potenciadores, fluoroquinolonas, aminoglucósidos, macrolidos y polimixina, de las cepas productoras de β -Lactamasas espectro extendido (β LEE) aisladas.

V. MARCO TEÓRICO

La importancia de conocer el comportamiento fenotípico y genotípico de un microorganismo comprometido en casos clínicos de animales de consumo humano, radica en poder descubrir la magnitud del problema de salud pública al que nos enfrentamos, en el hallazgo de diferentes mecanismos de resistencia a los antibióticos.

5.1 Bacteria *Escherichia coli*

E. coli es un bacilo gramnegativo de la familia *Enterobacteriaceae*, fue bautizado en honor al descubridor Theodor Escherich en 1958 (Thomas & College, 2015), es móvil y capaz de fermentar lactosa y glucosa, anaerobio facultativo; además, es la especie bacteriana predominante de la microbiota normal del aparato digestivo de la mayor parte de los animales incluyendo al hombre (Sokja, 1965), por tanto, se elimina por las heces al exterior. (Rym Ben Sallem, y otros, 2014) (Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), 2012, pág. 75). La mayoría de las cepas son comensales, pero algunas son patógenas (Thomas & College, 2015, pág. 52)

5.2. *Escherichia coli* en aves

En Aves, *Escherichia coli*, es una bacteria comensal del intestino, sin embargo, las cepas de *Escherichia coli* Aviar Patogénica (APEC) producen colibacilosis, esta enfermedad suele ser considerada secundaria, originada por un estado de inmunosupresión del ave debido a otras enfermedades víricas, bacterianas, por parásitos, ambientales o fisiológicas (Nataro & Kaper, 1998), en cuanto a la epidemiología, se encuentran mayores casos clínicos de afección respiratoria, las lesiones primarias multi orgánicas, como daños en los cilios traqueales,

alteración en el sistema respiratorio, etc. Esto facilitaría la entrada, colonización y diseminación secundaria de *E. coli*, que es causa de mortalidad y pérdidas económicas en las granjas avícolas. (Blanco, Alonso, Blanco, & Gonzalez, 1991, págs. 163-176).

Estos hechos son importantes debido a la frecuencia de su presentación y a la consecuente disminución de índices productivos y de bienestar animal (Abreu, y otros, 2013, pág. 1092).

La carne de aves destinadas al consumo humano, durante su sacrificio, puede contaminarse con las cepas de *E. coli* y producir patogenicidad entérica posterior para el consumidor, sin embargo, en humanos existen también infecciones extra intestinales asociadas, tales como infección del tracto urinario, entre otros. (Meena , y otros, 2015, pág. 251) (Polanco & Loza, 2013, pág. 211). Se plantea el posible origen animal de cepas multidrogoresistentes de *E. coli* implicadas en infecciones urinarias en clínica humana. (Wang, y otros, 2014) (Torres & Zarazaga, BLEE en animales y su importancia en la transmisión a humanos, 2007)

5.3. Respuesta bacteriana frente al antibiótico

En 1928, Alexander Fleming descubrió la penicilina, con ello se dio el inicio al descubrimiento de nuevas clases de antibióticos (Acuña, 2002), los cuales lamentablemente se utilizaron amplia e indiscriminadamente y durante tanto tiempo, que los microorganismos infecciosos para los que estaban diseñados, desarrollaron vías de adaptación, utilizando diferentes mecanismos de resistencia como defensa, con el fin de evadir la acción destructiva de estas sustancias, disminuyendo la eficacia de estos (Patiño, 2003), lo que culmina en una destrucción de microorganismos comensales y perpetuación de microorganismos resistentes, por selección natural. (Iglesias Leal, 2009, pág. 26); esto incrementa los problemas relacionados con el tratamiento de enfermedades infecciosas en la práctica médica, la perpetuación de bacterias resistentes, hace cada vez más necesario el uso de nuevos antimicrobianos, más costosos y tóxicos para el paciente. (Cabrera, Gómez, & Zuñiga, 2007, pág. 3).

5.4. Defensa de *Escherichia coli*

Evidenciar los tipos de resistencia en el laboratorio es sumamente importante para evitar la falla terapéutica, entre los tipos de resistencia están la resistencia intrínseca o natural, como ejemplo en el estudio se encuentra la diferencia de la membrana de bacterias Gram negativas como es el caso de *E. coli*, las cuales producen que algunos antibióticos no encuentren la diana adecuada donde ejercer su efecto, movilidad por flagelos, presenta porinas, pared celular, etc. (Farré, y otros, 2012, pág. 78)

Por otro lado, la resistencia extrínseca o adquirida, es la más importante, ya que, al ser impredecible, es la causa más importante de falla terapéutica, es de origen genético, producida por una mutación en el material genético o adquisición de ADN exógeno, que codifica el mecanismo de resistencia entre bacterias y permite el cambio de alguna cualidad que afecta al antimicrobiano o a su diana, finalmente dicha cepa será seleccionada de entre todas las existentes para perpetuarse; se transfieren estos genes mediante transformación, transducción y/o conjugación, la forma más eficaz y poderosa de propagación de la información genética es por intermedio de los plásmidos donde adquiere material genético del exterior (plásmidos R o factores R) (Norman, Hestbjerg Hansen, Qunxin , & Johannes Sørensen, 2008), permitiendo un posterior fenómeno de selección y “depuración” de la resistencia, ocurre con facilidad causando el fracaso terapéutico por resistencia clínica. (Hawkey, 1998).

En ese sentido, la bacteria puede presentar uno o más mecanismos de resistencia, que pueden ser mecanismos genéticos y/o bioquímicos, además, estos mecanismos pueden coexistir simultáneamente en la misma bacteria. (Tafur, Torres, & Villegas, 2008, pág. 226)

De esta manera queda evidenciada la inmensa plasticidad genética de patógenos bacterianos, que desencadenan en respuestas específicas, dando lugar a adaptaciones mutacionales o adquisición de material genético o alteración de la expresión génica, que produce resistencia a

prácticamente todos los antibióticos actualmente disponibles en la práctica clínica. (Tafur, Torres, & Villegas, 2008, pág. 226)

Además, el mecanismo bioquímico más utilizado por los bacilos Gram negativos para adquirir resistencia a penicilinas y β -lactámicos en general, es la inactivación de las drogas por enzimas β -lactamasas, mecanismo involucrado en la presente investigación (Tafur, Torres, & Villegas, 2008).

La identificación correcta del microorganismo, en su efecto vislumbrará y evidenciará a partir de técnicas fenotípicas y genotípicas los mecanismos de resistencia que presenta, especialmente la extrínseca o adquirida pues es la causa más frecuente de falla terapéutica, ya que refleja la verdadera alteración genética en la población del microorganismo que produce la disminución en la acción del antimicrobiano.

5.5. Inactivación enzimática por β -lactamasas

Las β -lactamasas (β LA) son enzimas cuyo sustrato son los antibióticos β -lactámicos ($A\beta$ L), los cuales son los más utilizados en la terapéutica frente a infección bacteriana.

Los bacilos Gram negativos comúnmente adquieren resistencia a penicilinas y β -lactámicos, por mecanismos bioquímicos de inactivación de drogas, gracias a enzimas β -Lactamasas, que hidrolizan el enlace amida del anillo β -lactámico de todos los antibióticos β -lactámicos, perdiendo capacidad de unión de penicilina a las proteínas PBPs, y dando así lugar a compuestos sin actividad antibacteriana, constituyen el mecanismo de resistencia más difundido entre la población bacteriana

Las enzimas β -Lactamasas son clasificadas según la secuencia de aminoácidos, su estructura molecular sobre todo su centro activo. Existen cuatro clases de enzimas: A, B, C, y D (B & Ambler, 1980).

Las enzimas de clase A, C y D poseen serina en su centro activo, que reacciona con el anillo β -lactámico, abriéndolo irreversiblemente e inactivando el antibiótico; mientras que las enzimas de clase B poseen Zinc en su centro activo (metaló β -Lactamasas), que reacciona con el grupo carbonil del enlace amida del β -lactámico, inactivándolo.

Según la clasificación de Bush, también se divide en 4 grupos funcionales (1, 2, 3 y 4) se basa en sus características de afinidad por el sustrato y la acción de los inhibidores (Bush, Jacoby, & Medeiros, 1995).

5.6. β -lactamasas de espectro extendido (β LEE)

El principal mecanismo de resistencia de las enterobacterias tal como *Escherichia coli*, es la producción de β -lactamasas de espectro extendido (β LEE), estas son enzimas que fenotípicamente se caracterizan por conferir resistencia a penicilinas y cefalosporinas, hidrolizando A β L incluyendo las de tercera y cuarta generación; pueden ser inhibidas por el ácido clavulánico u otros inhibidores de β -lactamasas como tazobactam y sulbactam, son sensibles frente a cefamicinas (cefoxitin, cefotetam), y carbapenémicos (imipenem, meropenem, ertapenem) (Oliver & Cantón , 2004).

Las enzimas β -lactamasas de espectro extendido se encuentran dentro de la clasificación de Ambler en la clase A y en la clasificación de Bush en el grupo 2.

Además, las enzimas derivadas por mutaciones de las β -Lactamasas clásicas, se encuentran clasificadas en el grupo 2b, codifican genes *bla* (*bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M, entre otros), y la clase D de la clasificación Ambler y grupo 2d de la clasificación de Bush incluyen enzimas β LEE descritas por enzimas tipo OXA; frecuentemente asociadas a plásmidos conjugativos, lo cual facilita su diseminación entre distintos microorganismos de distintos géneros y grupos, confiriendo perfil de resistencia antibiótica múltiple.

Una característica típica de las enzimas β LEE es su capacidad de hidrólisis de antibióticos que contienen el grupo oximino, como cefalosporinas de tercera y cuarta generación. (Castro Alarcón, Carreón Valle, Moreno Godínez, & Alarcón Romero, 2008, pág. 115)

En humanos, el principal reservorio de cepas *E. coli* productoras de enzimas β LEE es el tracto digestivo, considerando que ciertos alimentos de origen animal, principalmente aves de corral, podrían ser fuente de transmisión de cepas productoras de enzimas β LEE al hombre (Junying, y otros, 2012, pág. 3668)

La European Food Safety Authority (EFSA) 2011, informa que es complicado determinar los factores de riesgo para la aparición cepas productoras de enzimas β LEE, por la falta de disponibilidad de datos o falta de precisión. (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2011)

5.7. Detección fenotípica confirmatorio para la presencia de β -lactamasas espectro extendido (β LEE)

El análisis fenotípico confirmatorio para la presencia de β -Lactamasas espectro extendido (β LEE), se puede utilizar el método de sinergia de doble disco, recomendado por el Comité de Antibiograma de la sociedad Francesa de Microbiología (Método de Jarlier 1988).

La presencia de β LEE se manifiesta por el efecto sinérgico entre el inhibidor de β LEE y los discos de A β L, si se presenta la formación de la imagen efecto de huevo, cola de pez o balón de futbol americano, se confirma cepa positiva productora de β LEE.

Para todas las cepas confirmadas productoras de β LEE, la interpretación de la prueba fue reportada como resistente para todas las penicilinas, cefalosporinas y aztreonam.

5.8. Detección genotípica de la presencia de β -lactamasas espectro extendido (β LEE)

Estas enzimas son mutantes de los genes que codifican para las β -lactamasas *bla*TEM-1 y *bla*SHV-1, se encuentran codificadas en plásmidos, por lo que son fácilmente transferibles a otras cepas bacterianas. La expresión de genes a partir de ADN total por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Navarro, Moreno, López, Fragoso, & Sánchez, 2005, pág. 65).

VI. ANTECEDENTES

En el Perú, la proteína de origen animal más consumida es la carne de aves, (Contreras S. , 2016, pág. 7), en el mes de diciembre del año 2016, la producción avícola presentó un incremento del 5,6% con respecto a la producción obtenida en diciembre 2015; según el Sistema Integrado de Estadística Agraria (SIEA), la producción de ave viva en diciembre de 2015 alcanzó 155000 toneladas, sin embargo en diciembre de 2016 la producción de ave viva aumento alcanzando 163000 toneladas. (Contreras S. , 2016, pág. 9).

Este crecimiento favorece a que mayor cantidad de empresas se dediquen a la crianza intensiva de estos animales, y según la revista científica y técnica de la universidad de Murcia, España, indica que el mayor riesgo de excreción de agentes patógenos, post infección lo presentan aves cuyo sistema inmunitario se encuentra comprometido, como en las explotadas intensivamente con sistemas de producción forzada, aves jóvenes, recién capturadas en la naturaleza. (Contreras , y otros, 2016, pág. 4)

La OIE y el Farm Animal Welfare Council del Reino Unido en 1979 (FAWC, 1979), a fin de contemplar las necesidades físicas y de comportamiento de los animales, estableció que los animales de granja deben tener: libertad de no padecer hambre ni sed; libertad de no sufrir molestias; libertad de no sufrir dolor, heridas o enfermedades; libertad de expresar un comportamiento natural; libertad de no padecer miedo ni angustia. (Janet Nicol & Davies, 2016, pág. 2)

La importancia de la presencia de los médicos veterinarios en un establecimiento de crianza intensiva de animales, se justifica para cubrir las necesidades establecidas sobre salud, “Un animal convaleciente debe ser atendido por un médico veterinario a la brevedad, además de atender cada patología específica, se debe evaluar la existencia de dolor y, eventualmente, paliar el mismo mediante la administración de productos veterinarios y otras técnicas

existentes” (Ponce del Valle, Vicari , Florencia Faravelli, Glauber, & Winter, 2015, pág. 25).

La ausencia de profesionales, conduce al uso indiscriminado de antibióticos y muchas veces en terapias empíricas, (Cabrera, Gómez, & Zuñiga, 2007, pág. 3), las consecuencias son el desarrollo de resistencia bacteriana frente a los antibióticos y este es un importante problema de salud pública, que afecta en ámbitos de medicina humana, veterinaria, seguridad alimentaria como ambiental en Perú.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud Animal (OIE) han mostrado especial interés en el preocupante problema de salud pública, relacionado con el uso indiscriminado de antibacterianos, el surgimiento de cepas bacterianas resistentes a estos y su impacto en la salud humana y animal. (Acar, y otros, 2004, pág. 5).

Según la publicación del gobierno británico, estas bacterias, inmunes a los fármacos conocidos, gracias a mutaciones espontaneas desarrolladas, matarán a 10 millones de personas cada año a partir de 2050, más que el cáncer (8,2 millones de fallecimientos) (O'Neill, 2014).

La OMS anuncio las 12 familias de bacterias más peligrosas para el ser humano, como prioridad crítica se encuentra la familia *enterobacteriaceae* resistentes a los carbapenemicos y productores de β -Lactamasas de espectro extendido (β LEE) (Organización Mundial de la Salud, 2017).

Por otra parte, la presente investigación fue realizada en aves de consumo humano, ya que distintos autores plantean que la cadena alimentaria puede ser un vehículo importante de transferencia de genes de resistencia hacia el ser humano, además se ha sugerido presencia de cepas de *E. coli* portadoras de β LEE de origen alimentario, en la microbiota intestinal de humanos (Herrera , 2015, págs. 16, tesis doctoral). En la misma línea, también se ha planteado el posible origen animal de cepas multirresistentes de *E. coli* implicadas en infecciones urinarias en clínica humana (Ramchandani, y otros, 2015, pág. 254).

La primera publicación sobre detección de β LEE en bacterias de origen animal, fue en el año 2000, hacía referencia a una cepa de *E. coli* (EC98/4153-2) portadora de gen *blaSHV*-12, esta cepa fue aislada en 1998, por el servicio de microbiología y parasitología de la Universidad Complutense, en su hospital veterinario, ubicado en Madrid España; el paciente era un perro con infección recurrente del tracto urinario. Ésta cepa fue presentada a la red de vigilancia veterinaria de resistencia antimicrobiana (VAV); sin embargo, fueron amplificadas por PCR los genes *blaSHV* y *blaTEM*, obteniendo como resultado la amplificación por PCR de *blaTEM* negativa, mientras que se obtuvo un amplicón positivo solo para *blaSHV*, dicho producto de PCR *blaSHV* se purificó. La secuencia de aminoácidos del amplicón SHV correspondió a β -Lactamasa tipo SHV-12 (Sociedad Americana de Microbiología, 2000, pág. 3483).

En la universidad de la Rioja y la Red de Vigilancia Veterinaria de Resistencia a Antimicrobianos (Universidad Complutense de Madrid), se realizó un muestreo para la detección de enzimas β LEE en cepas de *E. coli* procedentes de muestras fecales de pollos “sanos”, recogidas en matadero; se analizó una cepa por muestra (un lote de animales supone una muestra). En un primer muestreo, realizado en 2000- 2001, se detectaron cepas de *E. coli* portadoras de *blaSHV*- 12, *blaCTX*-M-14, en el 1,6% de los aislados analizados, ellos refieren que “el uso de las cefalosporinas de amplio espectro en pollos son muy inusuales, y la posibilidad de selección cruzada con otros antimicrobianos utilizado en aves de corral (como sulfonamidas y tetraciclinas, entre otros) podría explicar este descubrimiento y debería ser más analizado en el futuro” (Briñas L. , y otros, 2003, pág. 2057); en un segundo muestreo de monitorización, realizado en 2003, se evidenció un aumento en porcentaje y variedad de cepas de *E. coli* portadoras con presencia de enzimas β LEE (5%) y en su diversidad (*blaCTX*-M-14, *blaCTX*-M-9, *blaSHV*-12), indicaron continuar con la supervisión e investigar su evolución y analizar los factores que contribuyen a su selección y difusión. (Briñas L. , y otros, 2005, pág. 1263)

En España. Se realizó un estudio en 6 granjas de la isla Tenerife, obtuvieron 90 muestras de exudados rectales en pollos, con un porcentaje de 86,6 para la presencia de enzima β LEE, La multiresistencia observada incluye cefalosporinas de tercera generación, aminoglucósidos, quinolonas y cotrimoxazol. Las mayores resistencias, sin considerar a los β -lactámicos no carbapenémicos, aparecen en las quinolonas (ácido nalidixico y ciprofloxacino), seguido del trimetropin /sulfametoxazol (cotrimoxazol).. (Abreu, y otros, 2013, pág. 1093).

En Cataluña un amplio estudio de detección y caracterización de β LEE en cepas de *E. coli*, obtenidas en granjas de pollos, cerdos y conejos, utilizó para el aislamiento placas suplementadas con cefotaxima; detectó un mayor número y variedad de enzimas β LEE entre las cepas de *E. coli* de pollos (*bla*CTX-M-1, *bla*CTX-M-14, *bla*CTX-M-9, *bla*CTX-M-32, *bla*SHV-12, *bla*SHV-2, *bla*SHV-5 y *bla*TEM-52), y un menor número y variedad entre las cepas de cerdos (*bla*CTX-M-1, *bla*SHV-12 y *bla*SHV-5) y conejos (*bla*CTX-M-14 y *bla*CTX-M-9). (Blanc, y otros, 2006, pág. 301)

En Japón se realizó la caracterización de enzimas β LEE presentes en cepas aisladas en heces de animales sanos, que son destinados al consumo humano en otros países, se detectó la presencia de *bla*CTX-M-2 y *bla*CTX-M-14 en pollos, y *bla*CTX-M-2 en ternera, además, en pollos de engorde, sugieren que las transferencias de genes de resistencia se deben posiblemente a su entorno específico, los plásmidos que codifican las β LEE de tipo CTX-M en *E. coli* durante la etapa de cría de pollos de engorde. (Kojima, y otros, 2005, pág. 3533)

En China, un estudio describe por primera vez la aparición de *E. coli* productora de *bla*CTX-M y *bla*CMY-2 entre granjas en la provincia de Guangdong, Las β LEE de tipo *bla*CTX-M fueron las más comunes, como *bla*CTX-M-3, *bla*CTXM-13, *bla*CTX-M-14, *bla*CTX-M-24 y *bla*CTX-M-27, el grupo CTX-M-9 fue el predominante se han detectado en aves y cerdos. Además, el problema de resistencia para uso común los agentes antimicrobianos son muy serios

en estas granjas, el 98% de los aislados de *E. coli* fueron resistentes a tetraciclina, 79% para ampicilina y 79% para ciprofloxacina (Hua Liu, y otros, 2007, pág. 577)

En Dinamarca, se halló la primera cepa de *E. coli* con presencia de gen *bla*TEM-52, el amplicón de 957 pb, y por la secuenciación se identificó como *bla*TEM-52, hallada en carne de ternera vendida destinada a consumo humano, indican que *bla*TEM-52 se ha encontrado en alta prevalencia entre *E. coli* de pacientes en hospitales canadienses, además la resistencia a las cefalosporinas se transfirió por conjugación, lo que indica que *bla*TEM-52 estaba ubicado en un elemento de ADN móvil. (Bogo Jensen, Hasman, Agersø, Dorthe Emborg, & Aarestrup, 2006, pág. 793)

La resistencia a múltiples fármacos, se asocia a plásmidos contenidos en las bacterias, y potencial de virulencia entre *Escherichia coli* patogénica, que pueden servir como reservorios de plásmidos de resistencia para *E. coli* extraintestinales patógena y comensales, estos plásmidos se encuentran con frecuencia en cepas *E. coli* procedentes de aves de corral (Johnson, y otros, 2012, pág. 44).

En Países Bajos, realizaron un estudio para comparar las cepas de *E. coli* con presencia de enzimas β LEE en humanos que expenden la carne (n= 43), hemocultivos humanos (n=15), con las existentes en carne de pollo vendida al por menor (n=87). Encontraron que la transferencia de elementos genéticos móviles, como la transferencia directa de cepas de la carne de pollo probablemente contribuyan a la aparición de *E. coli* β LEE en las infecciones humanas, por las similitudes genéticas significativas entre aislamientos, de carne de pollo y humanos según elementos de resistencia móvil, genes de virulencia y estructura genómica. (Kluytmans, y otros, 2013, pág. 484)

En Holanda se realizó un estudio de prevalencia de *E. coli* con presencia de enzimas β -lactamasas (β LEE) y AmpC en las granjas de pollos de engorde y en los agricultores holandeses, se comparó las cepas de los animales con las humanas. Los resultados de

positividad en los pollos del 80% y el 33,3% (6/18) en granjeros; además los genes blaCTX-M-1, blaCMY-2 y /o blaSHV-12, también estaban presentes en las muestras de sus animales; también 5 aislamientos presentaron genes localizados en familias de plásmidos idénticos, y en aislamientos de dos agricultores los genes se llevaron a subtipos de plásmidos idénticos como en los aislados de sus animales, por lo tanto se, muestra el riesgo salud humana, y la investigación futura debería centrarse en la identificación de la cadena de producción de pollos con presencia de los genes, para hacer intervenciones preventivas cuyo resultado sea la reducción de estas cepas. (Dierikx, y otros, 2013, pág. 60)

Estudios realizados en Perú, se muestra por ejemplo la diseminación de las enzimas β -lactamasas de espectro extendido (β LEE) tipo CTX-M en *Escherichia coli* aisladas de niños sanos menores de cuatro años. (Pallecchi, y otros, 2007)

Esta investigación tiene relevancia, ya que en Perú no hay estudios de detección fenotípica y genotípica de *Escherichia coli* productoras de β -Lactamasas de espectro extendido en aves de consumo humano, por lo que el control de la emergencia de mecanismos de resistencias producidos en cepas aisladas en estas aves es limitado.

Anexo 1: β LEE descritas en cepas de *Escherichia coli* de origen animal (Torres & Zarazaga, BLEE en animales y su importancia en la transmisión a humanos, 2007, pág. 31)

VII. HIPÓTESIS

Existen cepas de *Escherichia coli* productoras de β -Lactamasas de espectro extendido en aves de consumo humano en Perú

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Lugar de ejecución

El Laboratorio Bioservice SRL ubicado en el Departamento de Lima, distrito de Villa María del Triunfo realiza el análisis de muestras de animales procedentes de distintas empresas de crianza intensiva con propósito alimentario ubicadas en todo el Perú. La investigación se centró en analizar cepas aisladas de aves de consumo humano procedentes de 26 empresas ubicadas en 5 departamentos del país entre noviembre del 2015 y noviembre del 2016.

8.2. Diseño de estudio

En la presente investigación se desarrolló un método de estudio retrospectivo, transversal diseño descriptivo.

8.3. Operacionalización de variables

visualizar el Anexo 2.

8.4. Muestreo: Población de estudio, selección y tamaño de muestra, tipo de muestreo unidad de análisis.

Se consideró n=185 aislamientos de todas las cepas de *Escherichia coli* aisladas en necropsias de órganos de pollos y gallinas procedentes de 26 empresas ubicadas en los departamentos

Trujillo, Lima, Ica, Arequipa, Ucayali, cuyas muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Microbiología de la empresa Bioservice S.R.L entre noviembre del 2015 y noviembre del 2016.

Población: cepas de *Escherichia coli* aisladas en necropsias de órganos de pollos y gallinas que cumplieron con los criterios de selección (inclusión y exclusión) para el estudio.

Muestra: En el presente estudio no se calculó una muestra; por lo que se consideró a todas cepas de *Escherichia coli* aisladas en necropsias de órganos de pollos y gallinas de las retrospectivas entre noviembre del 2015 y noviembre del 2016, que cumplan con los criterios de selección propuestas en este protocolo.

8.5. Criterios de inclusión y exclusión

Para participar en el estudio las empresas cumplieron con los criterios de selección

Criterios de inclusión

De las aves: Se incluyeron todas las aves ingresadas entre noviembre del 2015 y noviembre del 2016 que reunieron los siguientes criterios:

- Especie gallinas o pollos.
- Necropsia realizada en el laboratorio de microbiología de Bioservice SRL
- Edad indiferente.
- Estado de salud, sanos o enfermos.
- Raza indiferente.
- Registrada en empresas tecnificadas o semi-tecnificadas del Perú.
- Género hembra o macho.
- Crianza intensiva
- Ave con ficha de recolección de datos disponible.
- Que recibió o no Promotores nutricionales u otros aditivos.

Criterios de exclusión

No participaron en el estudio aquellas empresas que cumplieron con las siguientes características:

- Órganos de aves con cultivos negativos para *E. coli* y/o cepas muertas.
- Muestras de órganos referidas y/o necropsias realizadas fuera del Laboratorio Bioservice SRL.
- Aves con ficha de recolección de datos incompletos.
- Aves referidas fuera de las fechas entre noviembre del 2015 y noviembre del 2016

8.6. Procedimiento para la recolección de los datos

Llenado manual de fichas de recolección con datos de las empresas (Fotografía 1)

8.7 Metodología

Materiales:

- Material biológico: *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603, cepas viables de *E. coli* provenientes de aves de consumo humano.
- Reactivos y químicos: Discos de antibióticos: cefalotina (KF) (30 µg), cefuroxima (CXM) (30 µg), ceftriaxona (CRO) (30 µg), cefotaxima (CTX) (30 µg), aztreonam (ATM) (30 µg); disco del inhibidor amoxicilina- ácido clavulánico (AMC) (20/10 ug), tubos con 4ml de suero fisiológico estéril, placas con agar MacCONKEY de 4 mm de grosor, placas con agar Muller-Hinton (MH) de 4 mm de grosor, estándar 0.5 de turbidez de McFarland, kit de extracción de ADN, master mix, enzimas, forward, reverse.
- Instrumentos: Pinzas, pipetas de un solo canal, mechero bunsen, gradillas, asa bacteriológica en punta (bioquímica), asa bacteriológica de siembra, beaker, probetas, tubos de ensayo, Matraz Erlenmeyer, placas de Petri, portaobjetos, agitador, espátula, escobillones, guía de carga de muestras, placas de vidrio con espaciadores integrados (Electroforesis),

- Equipos: Cabina de seguridad biológica, estufa incubadora de 37°C, congelador, termociclador, transiluminador, centrifuga, baño maría, equipo electroforético, autoclave, balanza, aire acondicionado
- Material desechable: Puntas de pipeta estériles, tubos de micro centrifuga, hisopos estériles, placas PCR, films, papel de aluminio, guantes, scrub y mandil, cofia, cubre boca rígida, cubre Calzado.

Para mayor detalle, observar fotografías desde la 3 hasta la 8.

8.7.1. Aislamiento microbiológico de *Escherichia coli*

En las fechas cuando las aves destinadas al consumo humano, fueron remitidas para su análisis y sometidas a necropsias entre noviembre del 2015 y noviembre del 2016, se realizó el aislamiento de *E. coli* obteniendo asépticamente 185 hisopados de diferentes órganos en las necropsias, se incluyeron los órganos de cerebelo (CE), cornete nasal (CN), seno infraorbitario (SI), tráquea (T), sacos aéreos (SA), pulmón (P), bazo (B), Hígado (H), intestino delgado (ID), intestino grueso (IG), ciego (C), mesenterio (M), Cavidad abdominal (C. Abd), cavidad celomica (C. Cel), saco vitelino (SV), los cuales se sembraron en agar MacConkey (Merck KGaA), se incubaron a 37°C por 24 a 48 horas, bajo condiciones aeróbicas.

La identificación fenotípica y confirmación se realizó mediante la morfología de las colonias, características de crecimiento, tinción Gram y pruebas bioquímicas convencionales: TSI (Oxoid®, UK), LIA (Oxoid®, UK), SIM (Oxoid®, UK), indol (Oxoid®, UK) y citrato (Oxoid®, UK); cada cultivo positivo de la especie *Escherichia coli* fue conservado en el cepario del Laboratorio hasta su uso.

8.7.2. Viabilidad de cepas y recolección de datos

Las cepas confirmadas de *E. coli* y almacenadas en el área de Cepario del laboratorio Bioservice SRL se replicaron en Agar MacConkey (Merck KGaA) entre 20 de enero y 05 de marzo del 2017, determinándose la viabilidad, mediante la presencia o ausencia de crecimiento en el agar, se incubó a 37°C por 24 horas.

Se realizó el llenado de la base de datos con la información de la empresa de donde proviene cada aislamiento viable, que forma parte de la investigación, se obtuvo información de cada cepa en los años que se remitieron, sobre resistencia bacteriana obtenida frente a antibióticos para las pruebas de rutina en los laboratorios de microbiología veterinaria según la NCCLS (grupo A, B y C aprobados por la FDA para su uso en enfermedades de especie animal), todos los aislamientos viables están almacenados en crioviales graduados y rotulados, a -5 °C en caldo cerebro corazón con glicerol al 20%.

8.7.3. Detección fenotípica confirmatoria de enzimas β -lactamasas de espectro expandido (β LEE)

La detección fenotípica confirmatoria de enzimas β LEE se realizó por el método de sinergia de doble disco según el comité de antibiograma de la Sociedad Francesa de Microbiología (Jarlier); a partir de colonias aisladas, replicadas en una placa de cultivo de agar MacCONKEY (Merck KGaA) y quienes fueron incubadas 24 horas a 37°C en la estufa comprobando su viabilidad.

Se rotularon e inocularon placas de Mueller Hinton (Merck KGaA), posteriormente con un hisopo estéril que contuvo la suspensión bacteriana de cada muestra, a una turbidez del tubo con suero fisiológico equivalente al N.º 0,5 de la escala de Mc Farland (aproximadamente 1 a 2 x UFC/ml de *E.coli* ATCC 25922), el hisopo se sumergió por 15 minutos previo a la inoculación y posteriormente se dejó secar el inóculo en la placa por 5 minutos a temperatura ambiente.

Se situaron los discos de antibiótico, colocando un disco del inhibidor Amoxicilina-ácido clavulánico (AMC) (20/10 µg) en el centro de la placa Petri con agar Mueller Hinton inoculado, y alrededor, a 20 mm de distancia de centro a centro entre los discos, se colocó cefalotina (KF) (30 µg), cefuroxima (CXM) (30 µg), ceftriaxona (CRO) (30 µg), cefotaxima (CTX) (30 µg), aztreonam (ATM) (30 µg). (Padilla Chumacero , 2011)

Finalmente se incubaron las placas en posición invertida a 37°C durante 24 horas en aerobiosis. Se realizó un ensayo piloto con las cepas ATCC *E. coli* ATCC 25922, negativa para la expresión de enzimas β-lactamasas de espectro expandido (βLEE), del mismo modo con la cepa *K. pneumoniae* ATCC 700603 positiva para la expresión de enzimas β-lactamasas de espectro expandido (βLEE); luego de estandarizar el procedimiento se realizó el mismo método para las 185 cepas de *E. coli* aisladas en necropsias.

Todo material utilizado se esterilizó y posteriormente se desechó.

8.7.4. Caracterización de genes que codifican β-lactamasas

Se extrajo ADN de cada aislado bacteriano usando el kit de extracción de ADN: GF-1 Tissue DNA extraction (Vivantis) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se amplificó por PCR utilizando cebadores *bla*TEM, *bla*SHV y *bla*CTX-M-1, los primers seleccionados fueron obtenidos a partir de fuentes comerciales (Macrogen), Los masters mix para cada uno de los genes se prepararon, la mezcla se detalla en la tabla 1.

La PCR se realizó en un termociclador Labcycler - SensoQuest GmbH; la mezcla de reacción se ajustó a un volumen final de 20µl (18 µl de master mix y 2 µl de ADN). Se incluyó un control positivo, negativo y blanco por cada reacción.

Los amplicones de PCR se visualizaron por electroforesis a 120V durante 35 minutos, en gel de agarosa 1,0% en buffer TBE 1X (Tris-Borato-EDTA) (Thermo Scientific®, USA),

utilizando la tinción Fluorescent dye reagent (geneON), finalmente se visualizaron los geles con un trans iluminador de Luz UV.

Tabla 1. Composición del master mix para cada uno de los genes (1 RX)

	ENZIMAS			
	GENES	<i>bla</i> CTX-M	<i>bla</i> SHV	<i>bla</i> TEM
Concentración Stock (Thermo Scientific)	Buffer [10X]	2 µl	2 µl	2 µl
	dNTP's [10mM]	0,4 µl	0,4 µl	0,5 µl
	Forward [10µM]	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl
	Reverse [10µM]	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl
	MgCl ₂ [25mM]	1,6 µl	1,6 µl	1,2 µl
	Maximo HS Taq Polymerase 5U/Ul	0,2 µl	0,8 µl	0,8 µl
	Agua de PCR	13,0 µl	12,4 µl	12,7 µl
	MASTER MIX HS			
	GENES	<i>bla</i> CTX-M	<i>bla</i> SHV	<i>bla</i> TEM
Hot Start	Master mix	10,0 µl	10,0 µl	10,0 µl
	Forward [10µM]	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl
	Reverse [10µM]	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl
	Agua de PCR	7,2 µl	7,2 µl	7,2 µl

Fuente: (Galván, Agapito , Bravo, Lagos, & Tamariz, 2016, pág. 25)

Tabla 2. Cebadores y condiciones de PCR método convencional

Gen	Primers: Forward, Reverse Secuencia (5→3)	Tamaño del fragmento (pb)	Condiciones de PCR
<i>bla</i> TEM	5' TTGGGTGCACGAGTGGGTTA 3' 5' TAATTGTTGCCGGAAGCTA 3'	503	2min a 94°C, 35 (30s a 95°C, 30s a 58°C, 1min a 72°C), 1min a 72°C
<i>bla</i> SHV	5' ATGCGTTATATTCGCCTGTG 3' 5' GTTAGCGTTGCCAGTGCTCG 3'	861	2min a 94°C, 35(30 s a 94°C, 30 s a 55°C, 1min a 72°C), 3min a 72°C
<i>bla</i> CTX-M-1	5' TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA 3' 5' CGATATCGTTGGTGGTGCCAT 3'	544	5min a 94°C, 35(2min a 94°C, 1min a 54°C, 1min a 72°C), 5min a 72°C

Adaptado de (Castro Alarcón, Carreón Valle, Moreno Godínez, & Alarcón Romero, 2008, pág. 116)

IX. Aspecto ético

Anexo 3: Documento de consentimiento informado para participar en el estudio de detección *Escherichia coli* productoras de β -Lactamasas de espectro extendido aisladas de aves de abasto en Perú

Anexo 4: Carta de presentación de la Universidad Ricardo Palma

Anexo 5: Carta de respuesta del laboratorio Bioservice SRL emitida por el Gerente General

X. RESULTADOS

A través del presente estudio se obtuvieron 185 cepas de *Escherichia coli* viables, aisladas en necropsias de órganos de pollos y gallinas procedentes de 26 empresas ubicadas en 5 departamentos del país Trujillo, Lima, Ica, Arequipa, Ucayali, dichas muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Microbiología de la empresa Bioservice S.R.L entre noviembre del 2015 y noviembre del 2016. En la tabla 3 se puede observar las 26 empresas enumeradas manteniendo la confidencialidad de cada una, además, algunas empresas presentan sucursales en varios departamentos.

Tabla 3. Ubicación por departamento de las 26 empresas con sus respectivas sucursales.

Departamentos	Lima	Ica	Arequipa	La Libertad	Ucayali
			1		
	2				
	3			3	
	4		4		
	5			5	
	6	6		6	6
	7		7	7	
			8		
	9		9	9	
	10		10	10	
	11			11	
		12		12	
	13	13		13	
	14				
	15				
	16			16	
	17				
	18				
	19				
	20				
	21				
	22				
	23				
	24	24	24		
			25	25	
	26				
Total	22	4	8	11	1

Adicionalmente en el grafico 1 se puede observar la cantidad aislamientos de *E. coli* de acuerdo a la procedencia de cada empresa incluyendo sus respectivas sucursales ubicadas en los distintos departamentos entre noviembre del 2015 hasta noviembre del 2016 que ingresaron las aves.

En la tabla 4 y grafico 2 se refleja el resultado del antibiograma, del total de los antibióticos empleados para el análisis protocolar de cepas que ingresaron al laboratorio, la resistencia observada es mencionada en orden de mayor a menor según la cantidad de cepas resistentes, del total de cepas viables utilizadas en el estudio.

Se observó resistencia a la familia de β -lactamicos (representado por amoxicilina con ácido clavulánico), seguido por tetraciclinas (oxitetraciclina), sulfa-potenciadores (sulfametoxazol y trimetoprim), fosfonatos (fosfomicina), fenicoles (florfenicol), fluorquinolonas (siendo la más representativa enrofloxacina), polimixina (colistina), cefalosporinas (cefalotina) y por ultimo macrólidos (tilmicosina).

Tabla 4. Antibiograma del total de las cepas de *E.coli* viables ingresadas al laboratorio entre 2015 y 2016.

Categoría	B-Lact	Tetrac	Cefal	Fenicol	Ac. Fofon	Sulfa-Poten	Fluoro	Aminog	Polimix	Macrol
S	18	9	4	63	68	23	34	0	137	1
I	4	12	0	16	8	3	10	1	27	0
R	162	160	10	105	108	158	101	0	10	3
S/A	1	4	171	1	1	1	40	184	11	181
Total	185	185	185	185	185	185	185	185	185	185

S: sensible, I: intermedio, R: resistente, S/A: sin analizar.

Adicionalmente, la tabla 5 muestra el antibiograma realizado en combinación de antibióticos, se observó resistencia a la fosfomicina con trimetoprim, luego la combinación de amoxicilina con enrofloxacin, seguido por la ciprofloxacina con doxiciclina, ciprofloxacina con amoxicilina, norfloxacina con amoxicilina y en último lugar levofloxacina con colistina.

Tabla 5. Antibiograma del total de las cepas de *E.coli* ingresadas al laboratorio entre 2015 y 2016.

Categoría	Lev+ Col	Cip+ Amox	Norf+ Amox	Cip+ Dox	Fosf+ Trim	Enro+ Amox	Linc+ Espec
S	78	41	53	34	27	21	0
I	48	29	20	33	5	14	1
R	48	104	99	105	142	137	0
S/A	11	11	13	13	11	13	184
Total	185	185	185	185	185	185	185

De acuerdo a los objetivos de la investigación, del total de las cepas viables analizadas, se detectó el 38,4% (71/185) de cepas de *Escherichia coli* productores de enzimas β LEE fenotípicamente confirmadas, 114 muestras no presentaron resistencia fenotípica, se reportó también el 33,5% (62/185) confirmado genotípicamente y 123 aislamientos no amplificaron los genes en evaluación, mayor detalle en tabla 6.

Tabla 6. Detección Fenotípica y genotípica de producción de enzimas β LEE en el total de las cepas viables de *Escherichia coli*

Enzimas β LEE	Fenotípico (%)		Genotípico (%)	
Si	71	38.4	62	33.5
No	114	61.6	123	66.5
Total	185	100.0	185	100.0

En el análisis fenotípico confirmatorio realizado para detectar la presencia de enzimas β -Lactamasas espectro extendido (β LEE) en las *E. coli* viables, se empleó el método de sinergia

de doble disco según el Comité de Antibiograma de la sociedad Francesa de Microbiología, la cual se manifestó por el efecto sinérgico entre el inhibidor y los discos, si se presentó la formación de la imagen efecto de huevo, cola de pez o balón de futbol americano, se confirma cepa positiva productora de enzimas β LEE, para mayor detalle observar fotografía 2.

Para todas las cepas confirmadas productoras de enzimas β LEE, la interpretación de la prueba fue reportada como resistente para todas las penicilinas, cefalosporinas y aztreonam.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la prueba fenotípica confirmatoria, el 38,4% (71/185) del total de las cepas aisladas son portadoras de enzimas β LEE, además, a continuación se muestra que en las 71 cepas portadoras de enzimas β LEE se observó la formación la imagen efecto de huevo, se observó la imagen en la familia de cefalosporinas: Cefalotina (Kf) 10,8% (20/185), Cefuroxima (CXM) 18,9% (35/185), Cefoxitina (FOX) 0,5% (1/185), Ceftriaxona (CRO) 32,4% (60/185), Cefotaxima (CTX) 15,7% (29/185), Ceftazidima (CAZ) 1,6% (3/185), Ceftizoxima (ZOX) 2,7% (5/185) y familia monobactam: Aztreonam (AZT) 17,3% (32/185). Mayor detalle en la tabla 7 y fotografía 2.

Tabla 7. Formación de la imagen que confirma fenotípicamente la presencia de enzimas β LEE en los aislamientos.

Familia	Antibiótico	Si (%)	No (%)	Total
Cefal 1°	KF	20 (10,8)	165 (89,2)	185 (100,0)
Cefal 2°	CXM	35 (18,9)	150 (81,1)	185 (100,0)
	FOX	1 (0,5)	184 (99,5)	185 (100,0)
Cefal 3°	CRO	60 (34,4)	125 (67,6)	185 (100,0)
	CTX	29 (15,7)	156 (84,3)	185 (100,0)
	CAZ	3 (1,6)	182 (98,4)	185 (100,0)
	ZOX	5 (2,7)	180 (97,3)	185 (100,0)
Monobac	ATM	32 (17,3)	153 (82,7)	185 (100,0)

KF: Cefalotina. CXM: Cefuroxima. FOX: Cefoxitina. CRO: Ceftriaxona, CTX: Cefotaxima. CAZ: Ceftazidima. ZOX: Ceftizoxima. ATM: Aztreonam.

En relación a los órganos de necropsia analizados en los que se encontró las 71 cepas de *E. coli* que producen enzimas β -Lactamasas espectro extendido (β LEE) según el método fenotípico confirmatorio, se observó mayor cantidad de cepas productoras en pulmón 18,3%, seno infraorbitario 15,5%, tráquea 12,7%, saco vitelino 11,3%, hígado y cornete nasal 9,9% cada cual, saco aéreo 7%, intestino delgado 5,6%, intestino grueso 4,2%, mesenterio, cerebelo, ciego y cavidad abdominal 1,4% cada cual, en bazo y cavidad celomica 0%, observado a mayor detalle en la tabla 8 y gráfico 3.

Tabla 8. Frecuencia de órganos de necropsia que presentaron enzimas β -Lactamasas espectro extendido (β LEE) según el método fenotípico confirmatorio.

Órganos	Muestras positivas	Frecuencia (%)
Pulmón	13	18.3
Seno Infraorbitario	11	15.5
Tráquea	9	12.7
Saco Vitelino	8	11.3
Cornete	7	9.9
Hígado	7	9.9
Saco Aéreo	5	7.0
I. Delgado	4	5.6
I. Grueso	3	4.2
Cav. Abdominal	1	1.4
Ciego	1	1.4
Mesenterio	1	1.4
Cerebelo	1	1.4
Bazo	0	0.0
Cav. Celomica	0	0.0
Total	71	100.0

Además, la cantidad de cepas productoras de enzimas β -Lactamasas espectro extendido (β LEE) según el método fenotípico confirmatorio descrita por departamentos de procedencia, se observó cepas provenientes de empresas ubicadas en el departamento de Lima con mayor continuidad 63,4% (45/71), seguido por empresas de Arequipa y Trujillo con el mismo valor porcentual de 16,9% (12/71), por ultimo Ica y Ucayali con 1,4% (1/71) cada departamento. Para mayor detalle observar la tabla 8 y gráfico 4.

Tabla 9. Presencia de cepas productoras de enzimas β LEE confirmadas fenotípicamente, según el departamento de procedencia.

Departamentos	Muestras positivas	%
Lima	45	63.4
Trujillo	12	16.9
Arequipa	12	16.9
Ica	1	1.4
Ucayali	1	1.4
Total	71	100.0

De acuerdo a la detección genotípica con la amplificación de genes por PCR, se reportó el 33,5% (62/185) confirmado genotípicamente del total de las muestras viables que fueron analizadas mejor detallado en tabla 5.

Además, en la expresión de cada gen analizado se encontró, el gen *bla*CTX-M-1 en 90,3% (56/62) de positividad, el gen *bla*SHV en 8,1% (5/62), sin embargo, el gen *bla*TEM no se logró expresar 0% (0/62).

Adicionalmente, se encontró en 1,6% (1/62) de los aislamientos, la coexistencia de los genes *bla*CTX-M-1 y *bla*SHV en la misma cepa analizada, mayor detalle en la tabla 9 y en resultados de PCR.

Tabla 10. Aislamiento de *E. coli* que expresó algún gen *bla* por PCR

Genes	N	%
<i>bla</i> CTX-M-1	56	90,3
<i>bla</i> SHV	5	8,1
<i>bla</i> TEM	0	0,0
<i>bla</i> CTX-M-1 y SHV	1	1,6
Total	62	100,0

N: cantidad de cepas de *E. coli* que expreso algún gen.

Como dato adicional, se encontró que las cepas *E. coli* productoras de enzimas β LEE fenotípicamente 38.4% (71/185), también fueron las que expresaron los genes mencionados en la tabla 9, con la excepción de 4,9% (9/71) que estaban confirmadas por el método fenotípico,

pero no amplificaron los genes *bla* en evaluación. Mayor detalle en la tabla 10. También se pueden observar los genes *bla* obtenidos de los aislamientos productores de β LEE según el método fenotípico confirmatorio, por cada empresa y sucursales procedente de los distintos departamentos en el grafico 5.

Tabla 11. Presencia de resistencia fenotípica y genotípica en las cepas de *E. coli*

		Fenotipo		
		Presencia (%)	Ausencia	
Genotipo	Determinado (%)	62 (33,5)	0 (0,0)	
	Indeterminado (%)	9 (4,9)	114 (61,6)	
Total		71 (38.4)	114 (61,6)	185(100,0)

Además, en el gráfico N°6 se observa la presencia genes *bla* amplificados de los aislamientos productores de enzimas β LEE por cada órgano analizado, siendo Pulmón el órgano más representativo para el gen *bla*CTX-M-1 con 23,2% (13/56), los órganos como hígado, intestino delgado, saco aéreo, saco vitelino y tráquea presentan el gen *bla*SHV con 20% (1/5), no se obtuvo la amplificación del gen *bla*TEM 0% (0/71); además 100% (1/1) de los aislamientos presento coexistencia de los genes *bla*CTX-M-1 y *bla*SHV de una cepa aislada de ciego. De las cepas aisladas y confirmadas fenotípicamente que no amplificaron para los genes *bla* en evaluación, resultó como órgano más representativo fue cornete nasal con 44,4% (4/9).

Por último, se halló que mayor cantidad de cepas productoras de β LEE fueron resistentes a tilmicosina y Azitromicina, y más cantidad de cepas sensibles gentamicina y cefoxitina del total de los antibióticos analizados, mayor detalle en el grafico 7.

XI. DISCUSIÓN

La excreción de agentes patógenos, post infección que presentan aves cuyo sistema inmunitario se encuentra comprometido, como en las explotadas intensivamente con sistemas de producción forzada, según la revista científica y técnica de la universidad de Murcia, España, muestra mayor riesgo de acuerdo al estudio en el departamento de Lima en Perú, con el incremento de las empresas dedicadas a la producción intensiva de aves, año a año mostrado por el Sistema Integrado de Estadística Agraria (SIEA), sin embargo, en futuros estudios es importante enfocarse en la resistencia adquirida, ya que muchas cepas de *E. coli* provenían de aves clínicamente sanas. Además, la importancia que distintos autores plantean, que la cadena alimentaria puede ser un vehículo importante de transferencia de genes de resistencia hacia el ser humano, radica en que la proteína animal más consumida en nuestro país, presenta bacterias comensales o patógenas con este tipo de resistencia. Adicionando el importante anuncio de la OMS, al indicar como prioridad crítica a la familia enterobacteriaceae productores de β -Lactamasas de espectro extendido (β LEE), que fue el tema de investigación.

En cuanto a los hallazgos de β LEE, tal y como se muestra en la cepa de *E. coli* (EC98/4153-2) aislada en 1998, de un perro con infección recurrente del tracto urinario, donde fueron amplificadas por PCR los genes *blaSHV* y *blaTEM*, obtuve el mismo resultado en la amplificación por PCR de *blaTEM* negativa, mientras que se obtuvo un amplicón positivo solo para *blaSHV*, del mismo modo que el presente estudio.

En nuestro estudio se aisló cepas de muestras de órganos de animales sanos y enfermos procedentes de necropsias, a diferencia del estudio en la universidad de la Rioja y la Red de Vigilancia Veterinaria de Resistencia a Antimicrobianos (Universidad Complutense de Madrid), donde se realizó un muestreo para la detección de enzimas β LEE en cepas de *E. coli* procedentes de 160 muestras fecales de pollos “sanos”, recogidas en matadero, se obtuvieron

resultados similares en la amplificación de genes *blaSHV*, *blaCTX-M-1*, sin embargo su muestreo en 2000- 2001 portaron SHV- 12 o CTX-M-14 en el 1,6% de los aislados analizados, a diferencia del presente estudio donde se analizaron 185 muestras de necropsias de animales sanos y enfermos, y portaron los genes *blaSHV* y gen *blaCTX-M-1* en 33.5 % del total de los aislados revisar la tabla 9 y 10, sin embargo, no se realizó la amplificación de los subtipos presentados en ese estudio. (Briñas L. , y otros, 2003, pág. 2057)

A diferencia del estudio en España que se realizó en 6 granjas de la isla Tenerife, donde obtuvieron 90 muestras de exudados rectales en pollos, con un porcentaje de 86,6 (36 cepas) para la presencia de enzima β LEE, en el presente estudio se analizaron aves procedentes de 26 empresas y se halló 38,4% (71 cepas) de 185 cepas *Escherichia coli* productoras de β LEE fenotípicamente provenientes de 26 empresas tecnificadas, la cifra del hallazgo es inferior pero significativo; y del mismo modo, la multirresistencia observada en ambos estudios incluyen cefalosporinas de tercera generación, aminoglucósidos, quinolonas y cotrimoxazol.

En Cataluña un amplio estudio de detección y caracterización de β LEE en cepas de *E. coli*, obtenidas en granjas de pollos, cerdos y conejos, utilizó para el aislamiento placas suplementadas con cefotaxima; hallaron un mayor número y variedad de enzimas β LEE entre las cepas de *E. coli* procedentes de pollos (*blaCTX-M blaSHV* y *blaTEM*), la diferencia con el estudio, es que utilizó el método de sinergia de doble disco según el Comité de Antibiograma de la sociedad Francesa de Microbiología, para evidenciar β LEE fenotípicamente, además, en los hallazgos genotípicos entre todas las especies obtuvieron la mayor cantidad con 73% de las cepas portadoras del gen CTX-M-1, del mismo modo se obtuvo CTX-M-1 en mayor cantidad con 90,3% del total de las cepas portadoras de algún gen β LEE observar la tabla 9, sin embargo, el gen *blaTEM* no fue amplificado, tampoco hubo amplificación de los subtipos de los genes amplificados y como muestra biológica solo se realizó en cepas de *E. coli* procedentes de aves de consumo humano.

En Japón se realizó la caracterización de enzimas β LEE presentes en cepas aisladas en heces de animales de engorde sanos, sin embargo, el estado de salud de las aves, no fue una condición para incluir o excluir en nuestro estudio, además ellos tampoco analizaron el gen CTX-M-1, pero la sugerencia, de que los plásmidos que transfieren genes de resistencia, sean los de tipo CTX-M en *E. coli* y durante la etapa de cría de pollos de engorde, ofrece la importancia que en el estudio se hallara en mayor cantidad los genes *bla*CTX-M-1 y que no se excluyeran a las aves por su edad.

En China, aparecen *E. coli* productora de *bla*CTX-M y *bla*CMY-2 entre granjas en la provincia de Guangdong, las β LEE de tipo *bla*CTX-M fueron las más comunes, como *bla*CTX-M-3, *bla*CTXM-13, *bla*CTX-M-14, *bla*CTX-M-24 y *bla*CTX-M-27, el grupo *bla*CTX-M-9 fue el predominante y se han detectado en aves y cerdos. Los resultados de la tesis, al igual que el anterior estudio muestran que la amplificación del gen *bla*CTX-M estuvo presente en mayor cantidad, pues se obtuvo 90.3% (56/62) cepas con la amplificación del gen, lo que indica la misma posibilidad de encontrar mayor cantidad de subtipos, los cuales podrían estar coexistiendo junto al analizado gen *bla*CTX-M-1.

Además, el problema de resistencia de agentes antimicrobianos de uso común son muy serios en estas granjas, el 98% de los aislados de *E. coli* fueron resistentes a tetraciclina, en el estudio realizado 86.5% (160/185) fueron resistentes a tetraciclina, también ellos obtuvieron 79% de resistencia para ampicilina, sin embargo en el estudio realizado no se analizó ampicilina y por ultimo también obtuvieron 79% de resistencia en ciprofloxacina, sin embargo en el estudio se encontró en menor frecuencia de resistencia a ciprofloxacino con 54.6% (101/185) (Hua Liu, y otros, 2007, pág. 577).

En Dinamarca se halló el gen *bla*TEM-52 en una cepa de *E. coli* de venta de una ternera destinada a consumo humano, sin embargo, en el presente estudio no se logró amplificar el gen

*bla*TEM ellos utilizaron un tamaño de fragmento de 957 pb, más amplio que el utilizado en este estudio de 503 pb.

La resistencia a múltiples fármacos, se asocia a plásmidos contenidos en las bacterias, se encuentran con frecuencia en cepas de *E. coli* procedentes de aves de corral, como se halló en el presente estudio la similitud de multiresistencia antibiótica, sin embargo, no se corroboró, que la presencia de la resistencia provenga de plásmidos; por lo tanto, no se puede afirmar que puedan servir o no, como reservorios de plásmidos de resistencia para *E. coli* extraintestinal patógena y comensal, sin embargo, hay razones importantes para amplificar el presente estudio. (Johnson, y otros, 2012, pág. 44).

En Países Bajos, realizaron un estudio para comparar las cepas de *E. coli* con presencia de enzimas β LEE en humanos vendedores de carne de pollo (n= 43), hemocultivos humanos (n= 15), con las existentes en carne de pollo (n= 87). Encontraron que la transferencia de elementos genéticos móviles, como la transferencia directa de cepas de la carne de pollo probablemente contribuyan a la aparición de *E. coli* β LEE en las infecciones humanas, por las similitudes genéticas significativas entre aislamientos, de carne de pollo y humanos según elementos de resistencia móvil, genes de virulencia y estructura genómica. En Perú hay abundantes estudios de *E. coli* productoras de β LEE en las infecciones humanas, sin embargo, no hay publicaciones de la detección de esta resistencia en carne de aves, el presente estudio servirá como base para estudios futuros poder detectar la relación en transferencia de elementos genéticos móviles.

De igual manera, en Holanda se realizó un estudio de prevalencia de *E. coli* β -lactamasas (β LEE) y AmpC en las granjas de pollos de engorde y en los agricultores holandeses y se comparó las cepas de los animales con las humanas. Los resultados de positividad en los pollos fueron del 80% y el 33,3% (6/18) en granjeros; además los genes *bla*CTX-M-1, *bla*CMY-2 y/o *bla*SHV-12, también estaban presentes en las muestras de sus animales; al igual que este

estudio donde se amplificó el gen *bla*CTX-M-1, sin embargo, se reportó el 33,5% (62/185) confirmado genotípicamente y 4,9% (9/185) sin gen *bla* determinado, la gran diferencia de positividad 80% en pollos para la presencia de resistencia, puede deberse a que el gen *bla*CMY-2 no fue expresado y tampoco se evaluó la resistencia AmpC; además no se realizó la subtipificación de plásmidos que realizaron en su estudio; teniendo en cuenta el control presente en Holanda con la colaboración del Centro Europeo de Prevención y Control de las Enfermedades (ECDC) y la firme voluntad política de acabar con la resistencia a antimicrobianos, el presente resultado en Perú es de gran importancia ya que al sumar la resistencia genotípica del estudio, 33.5% con gen determinado y 4.9% con gen indeterminado del total de cepas se presenta un total de 38.4%, que es significativo e importante para continuar el seguimiento, además, esta frecuencia fue hallada sin tener en cuenta los otros mecanismos de resistencia, ni los otros genes *bla* que incluyeron en el estudio de Holanda, muestra el claro riesgo que esto representa para la salud humana, para poder realizar intervenciones preventivas cuyo resultado sea la reducción de estas cepas. (Dierikx, y otros, 2013, pág. 60)

Estudios realizados en Perú, se muestra la diseminación de las β -lactamasas de espectro extendido (β LEE) tipo CTX-M en *Escherichia coli* aisladas de niños sanos menores de cuatro años, siendo el mismo gen con mayor predominancia en nuestro estudio (Pallecchi, y otros, 2007); esta investigación tiene relevancia, ya que en Perú no hay estudios de detección fenotípica y genotípica de *Escherichia coli* productoras de β LEE en aves de consumo humano, por lo que el control de la emergencia de mecanismos de resistencias producidos en cepas aisladas en estas aves, es limitado.

XII. CONCLUSIONES

La detección fenotípica de presencia de enzimas β LEE 38,4% fue significativa considerando el total de 185 cepas ingresadas al laboratorio privado, entre los años 2015 - 2016

Se logró expresar los genes por PCR, obteniendo en mayor frecuencia el gen *bla*CTX-M-1, con 90,3% del total de cepas que expresaron algún gen, en segundo puesto el gen *bla*SHV también se logró expresar 8,1%, sin embargo, no se obtuvo la expresión del gen *bla*TEM.

Adicionalmente se halló la coexistencia en la expresión de genes *bla*CTX-M-1 y *bla*SHV 1,6% del total de los aislamientos que expresaron algún gen, para mayor detalle observar la tabla 9.

Del total de las 71 cepas de *E. coli* que expresaron resistencia fenotípica, 62 cepas de las mismas, expresaron la presencia de genes *bla* en evaluación, sin embargo, las 9 cepas restantes no expresaron los genes en evaluación, pero si expresaron resistencia fenotípica, para mayor detalle observar la tabla 10.

La resistencia a antimicrobianos de uso protocolar, en las cepas *E. coli* productoras de β LEE confirmadas fenotípicamente, se confirma en las familias β -lactámicos, tetraciclinas, sulfapotenciadores, fosfonatos, fenicoles, fluorquinolonas, polimixina, cefalosporinas, macrólidos.

XIII. RECOMENDACIONES

Realizar monitoreo epidemiológico de resistencia antibiótica con presencia de β -lactamasas de espectro extendido y controlar las fuentes de transmisión al hombre.

Identificar la relación entre la transmisión de enzimas β LEE al hombre, los genes *bla* con sus respectivos subtipos y la presencia de plásmidos para descubrir aquellos factores que contribuyen a la transferencia de genes.

Realizar estudios complementarios, detectando los distintos tipos de resistencia en *E. coli* carbapenemasas, metalobetalactamasas, β -lactamasas de espectro ampliado, etc.

Realizar un control de laboratorio, periódicamente a los animales destinados al consumo humano.

Evitar el uso indiscriminado de antimicrobianos en terapias empíricas, consultar al profesional médico.

XIV. REFERENCIAS CITADAS

- Acar, J., Angulo, F., Bywater, R., Cerniglia, C., Collignon, P., De Vincent, S., . . . Stärk, K. (2004). *Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-Human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: scientific assessment*. Ginebra.
- Cabrera, C., Gómez, R., & Zuñiga, A. (Junio de 2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica*, 38(2), 11.
- Navarro, M., Moreno, B., López, B., Fragoso, M., & Sánchez, J. (2005). DETECCIÓN DE CEPAS DE *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* PRODUCTORAS DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (β LEE) EN EL HOSPITAL INFANTIL DEL ESTADO DE SONORA. *Medigraphic*, 64-70. Obtenido de <http://www.medigraphic.com/pdfs/bolclinhosinfson/bis-2005/bis052c.pdf>
- Torres, C., & Zarazaga, M. (2007). BLEE en animales y su importancia en la transmisión a humanos. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 25(2), 37. Obtenido de [file:///C:/Users/Usuario/Downloads/13112086_S300_es%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/13112086_S300_es%20(1).pdf)
- Abreu, R., Castro Hernández, B., Madueño, A., Espigares Rodríguez, E., Moreno Roldán, E., Moreno, P., . . . Arias, A. (Marzo de 2013). Cepas de *E. coli* productoras de betalactamasas (BLEE) aisladas en pollos en Tenerife (España). En *Higiene y Sanidad Ambiental* (Vol. 13, pág. 1096). Tenerife, España: ISSN. doi:PMC549238
- Acuña, G. (Enero de 2002). Descubrimiento de la Penicilina: Un Hito de la Medicina Cómo el azar puede ayudar al Científico. *Elsevier*, 13(1). Obtenido de <http://www.elsevier.es>
- B, & Ambler, R. (16 de May de 1980). The structure of B-lactamases. *Philosophical transactions of the Royal Society A*, 321-331. doi:10.1098/rstb.1980.0049
- Blanc, V., Mesa, R., Saco, M., Lavilla, S., Prats, G., Miro, E., . . . Llagostera, M. (2006). *ESBL- and plasmidic class C b-lactamase-producing E. coli strains isolated from poultry, pig and rabbit farms*. Cataluña, España: Elsevier B.V. doi:10.1016/j.vetmic.2006.08.002
- Blanco, J., Alonso, M., Blanco, M., & Gonzalez, M. (1991). Mecanismo de patogénesis de los *Escherichia coli* causantes de infecciones extraintestinales. En *Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica* (Vol. 6, pág. 176). Lugo, España.

- Bogo Jensen, L., Hasman, H., Agersø, Y., Dorthe Emborg, H., & Aarestrup, F. M. (27 de Febrero de 2006). First description of an oxyimino-cephalosporin-resistant, ESBL-carrying *Escherichia coli* isolated from meat sold in Denmark. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy, JAC*, 794. doi:10.1093/jac/dkl048
- Briñas, L., Moreno, M. A., Zarazaga, M., Porrero, C., Saenz, Y., García, M., . . . Torres, C. (2005). Monitoring and Characterization of Extended-Spectrum B-Lactamases in *Escherichia coli* Strains from Healthy and Sick Animals in Spain in 2003. En A. S. Microbiology, *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* (Vol. 49, pág. 1264). Madrid, España: ST ANDREWS UNIV. doi:10.1128/AAC.49.3.1262–1264.2005
- Briñas, L., Moreno, M., Zarazaga, M., Porrero, C., Saenz, Y., García, M., . . . Torres, C. (2003). Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12 B-Lactamases in *Escherichia coli* Fecal-Sample Isolates from Healthy Chickens. En *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* (Vol. 47, pág. 2058). Madrid, España. doi:10.1128/AAC.47.6.2056–2058.2003
- Bush, K., Jacoby, G., & Medeiros, A. (Junio de 1995). A Functional Classification Scheme for b-Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(6), 1211-1233.
- Castro Alarcón, N., Carreón Valle, E., Moreno Godínez, M., & Alarcón Romero, L. (Junio de 2008). Caracterización molecular de B-lactamasas de espectro extendido en aislamientos clínicos de *Escherichia coli*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 28(3), 114-120. Obtenido de <http://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2008/ei083e.pdf>
- Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). (19 de Septiembre de 2012). Medidas de prevención y recomendaciones aplicables para evitar posibles infecciones alimentarias por cepas de *Escherichia coli* verotoxigénicos/productores de toxinas Shiga/enterohemorrágicos (VTEC/STEC/EHEC). *Revista del comité científico n° 16*, 100. Obtenido de http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/evaluacion_riesgos/informes_comite/ESCHERICIA_COLI2.pdf
- Contreras, A., Gómez Martín, A., Paterna, A., Tatay Dualde, J., Prats van der Ham, M., Corrales, J., . . . Sanchez, A. (Diciembre de 2016). Papel epidemiológico de las aves en la transmisión y mantenimiento de zoonosis. *Revista científica y técnica.*, 35(3), 21. Obtenido de

http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Publications_%26_Documentation/docs/pdf/revue_plurithematique/2016/02112016-00082-ES-Contreras.pdf

- Contreras , S. (Diciembre de 2016). Boletín estadístico mensual de la producción y comercialización avícola. *Dirección General de seguimiento y evaluación de políticas, Dirección de Estadística Agraria*, 39.
- Dierikx, C., van der Goot, J., Fabri, T., van Essen-Zandbergen, A., Smith, H., & Mevius, D. (4 de septiembre de 2013). Extended-spectrum- β -lactamase- and AmpC- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, pág. 68. doi:10.1093/jac/dks349
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2011). Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals. *European Food Safety Authority (EFSA) Journal*, 9(8), 2322. doi:10.2903/j.efsa.2011.2322
- Farré, R., Bermudo, F., Cameán, A., Cepeda, A., Domingo, M., Herrera, A., . . . Vidal, C. (19 de Septiembre de 2012). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre medidas de prevención y recomendaciones aplicables para evitar posibles infecciones alimentarias por cepas de *Escherichia coli* verotoxigénicos/producto. *revista del comité científico n° 16, AESAN-2012-007*, 100.
- Freire, L., Moran, A., & et al. (2004). Critical shortage of new antibiotics in development against multidrug-resistant bacteria- time to react is now!. *Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (IDSA)*.
- Galván, F., Agapito , J., Bravo, N., Lagos, J., & Tamariz, J. (2016). Caracterización fenotípica y molecular de *Escherichia coli* productoras de B-Lactamasas de espectro extendido en pacientes ambulatorios de Lima, Perú. *Revista Médica Herediana*, 29.
- Hawkey, P. M. (5 de Septiembre de 1998). The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *The BMJ*, 317, 670.
- Herrera , A. (01 de Septiembre de 2015). Tesis doctoral. *El papel de los alimentos en la transmisión de Escherichia coli potencialmente patógenas para el hombre: prevalencia y caracterización de cepas diarreagénicas y productoras de β -lactamasas de espectro extendido (Tesis doctoral)*. Lugo, España.
- Hua Liu, J., Shu-Yong , W., Jun-Ying , M., Zhen-Ling , Z., Dian-Hong , L., Gui-Xiang, Y., & Zhang-Liu , C. (22 de Diciembre de 2007). Detection and characterisation of CTX-M and CMY-2 B-lactamases among *Escherichia coli* isolates from farm animals in

- Guangdong Province of China. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29, 581. doi:10.1016/j.ijantimicag.2006.12.015
- Iglesias Leal, R. (1 de Julio - Septiembre de 2009). La teoría de la “selección natural” de Darwin se cumple también en el espacio exterior. *Sistema de Información Científica Redalyc Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*, 27. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=441942917005>
- Janet Nicol, C., & Davies, A. (2016). Bienestar de las aves de corral en los países en desarrollo. *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Revisión del Desarrollo Avícola*, 5. Obtenido de <http://www.fao.org/docrep/016/al720s/al720s00.pdf>
- Johnson, T., Logue, C., Johnson, J., Kuskowski, M., Sherwood, J., Barnes, J., . . . Lisa, N. (2012). Associations Between Multidrug Resistance, Plasmid Content, and Virulence Potential Among Extraintestinal Pathogenic and Commensal *Escherichia coli* from Humans and Poultry. En D. P. Lisa K. Nolan, *FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE* (Vol. 9, pág. 46). Iowa, Estados Unidos: Mary Ann Lieber. doi:10.1089/fpd.2011.0961
- Junying, M., Jian-Hua , L., Luchao , L., Zhiyong, Z., Yan , S., Hongqing , Z., . . . Zhen-Ling , Z. (9 de March de 2012). *AEM Journals ASM org*, 3668 –3673. doi:10.1128/AEM.07507-11
- Kluytmans, J., Overdeest, I., Willemsen, I., Kluytmans-van den Bergh, M., van der Zwaluw, K., Heck, M., . . . Johnson, J. (15 de Febrero de 2013). Extended-Spectrum β -Lactamase–Producing *Escherichia coli* From Retail Chicken Meat and Humans: Comparison of Strains, Plasmids, Resistance Genes, and Virulence Factors. En P. d. Kluytmans, *Clinical Infectious Diseases* (Vol. 56, pág. 487). Paises Bajos, Paises Bajos. doi: 10.1093/cid/cis929
- Kojima, A., Ishii, Y., Ishihara, K., Esaki, H., Asai, T., Oda, C., . . . Yamaguchi, K. (Agosto de 2005). Extended-Spectrum--Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Farm Animals from 1999 to 2002: Report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. En S. Andrews, *Antimicrobial Agents and chemotherapy* (Vol. 49, págs. 3533-3537). doi: 10.1128/AAC.49.8.3533-3537.2005
- Ley de protección y bienestar animal. (7 de enero de 2016). *LEY N° 30407*. Lima, Lima, Perú. Obtenido de <https://busquedas.elperuano.pe/normaslegales/ley-de-proteccion-y-bienestar-animal-ley-n-30407-1331474-1/>

- Marrero-Moreno, C., Mora, M., Hernández, R., Báez, M., García, T., & Espinosa, I. (Diciembre de 2017). Identificación de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs) en instalaciones porcinas de la provincia Matanzas. *Rev. Salud Animal*, 39(3), 15. Obtenido de <http://scielo.sld.cu/pdf/ras/v39n3/ras06317.pdf>
- Meena, R., Ameer, M., Chitrita, D., Sherry P., S., James R., J., & Lee W., R. (15 de 06 de 2015). Possible Animal Origin of Human-Associated, Multidrug-Resistant, Uropathogenic Escherichia coli. *Infectious Diseases Society of America*, 257. Obtenido de <http://cid.oxfordjournals.org/>
- Montana. (2017). *Corpmontana*. Obtenido de http://www.corpmontana.com/avicultura_detalle.php?sC=271
- Nataro, J., & Kaper, J. (1998). Diarrheagenic Escherichia coli. *Clinical Microbiology Reviews*, 11:142-201.
- Norman, A., Hestbjerg Hansen, L., Qunxin, S., & Johannes Sørensen, S. (2008). Nucleotide sequence of pOLA52: A conjugative IncX1 plasmid from Escherichia coli which enables biofilm formation and multidrug efflux. *Plasmid*, 59-74. doi:10.1016/j.plasmid.2008.03.003
- O'Neill, J. (December de 2014). Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations (the AMR Review). *Review on Antimicrobial Resistance*, 20.
- Oliver, A., & Cantón, R. (2004). *Enterobacterias productoras de β -lactamasas plasmidicas de espectro extendido*. Madrid: Control calidad seimc.
- OMS. (27 de Febrero de 2017). *El País*. Obtenido de https://elpais.com/elpais/2017/02/27/ciencia/1488207618_921542.html
- Organización Mundial de la Salud. (27 de Febrero de 2017). *Who, Ginebra*. (O. Lawe Davies, & S. Bennett, Editores) Obtenido de <http://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- Padilla Chumacero, M. (Diciembre de 2011). Detección Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae mediante metodo de Jarlier. *Archivos Bolivianos de Medicina*, 16(84), 107. doi:ISSN 0004-0525
- Pallecchi, L., Bartoloni, A., Fiorelli, C., Mantella, A., Di Maggio, T., Gamboa, H., . . . Rossolini, G. (Agosto de 2007). Rapid Dissemination and Diversity of CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamase Genes in Commensal Escherichia coli Isolates from Healthy Children from Low-Resource Settings in Latin America. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 51(8), 2725. doi:10.1128/AAC.00026-07

- Patiño, D. (3 de Diciembre de 2003). ¿Por qué las bacterias se hacen resistentes a la acción de los antibióticos? *Umbral Científico*(3), 56. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30400307>
- Polanco, F., & Loza, R. (2013). Resistencia antibiótica en infecciones urinarias en niños atendidos en una institución privada, periodo 2007 – 2011. *Revista Medica Herediana*(24), 210-216.
- Ponce del Valle, M., Vicari, C., Florencia Faravelli, M., Glauber, C., & Winter, N. (Octubre de 2015). Un enfoque práctico para el buen manejo de especies domesticas durante su tenencia, producción, concentración, transporte y faena. *Manual de Bienestar Animal, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria SENASA, 1*, 164. Obtenido de http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/bienestar_animal.pdf
- Ramchandani, M., Manges, A., DebRoy, C., Smith, S., Johnson, J., & Riley, L. (16 de Junio de 2015). Possible Animal Origin of Human-Associated, Multidrug-Resistant, Uropathogenic Escherichia coli. *Major Article*, 7. doi:10.1086/426819
- Rym Ben Sallem, Karim Ben Slama, Rojo-Bezares, B., Porres Osante, N., Jouini, A., Klibi, N., . . . Torres, C. (2014). IncI1 Plasmids Carrying blaCTX-M-1 or blaCMY-2 Genes in Escherichia coli from Healthy Humans and Animals in Tunisia. *Microbial Drugs Resistance*. doi:10.1089/mdr.2013.0224
- Sociedad Americana de Microbiología. (Diciembre de 2000). Isolation of an SHV-12 β -Lactamase-Producing Escherichia coli Strain. *Agentes microbianos y quimioterapia, Sociedad Americana de Microbiología*, 44(12), 3484. doi:11185493
- Sociedad de las Enfermedades Infecciosas de América. (17 de Marzo de 2010). *News Medical Life Science*. Obtenido de <https://www.news-medical.net/news/20100317/34/Spanish.aspx#>
- Sokja, W. (1965). Escherichia coli in Domestic Animals and Poultry. En *Commonwealth Agricultural Bureaux* (págs. 157-168). Bucks, England: Farnham Royal.
- Tafur, J., Torres, J., & Villegas, M. (Septiembre de 2008). *Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas*. ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE INFECTOLOGÍA. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v12n3/v12n3a07.pdf>
- Thomas, T., & College, C. (Octubre de 2015). Theodor Escherich, who discovered the E. coli bacterium. *CMI*, 54. Obtenido de <https://cmijournal.files.wordpress.com/2015/10/52-54-history-of-medicine-theodor-escherich.pdf>

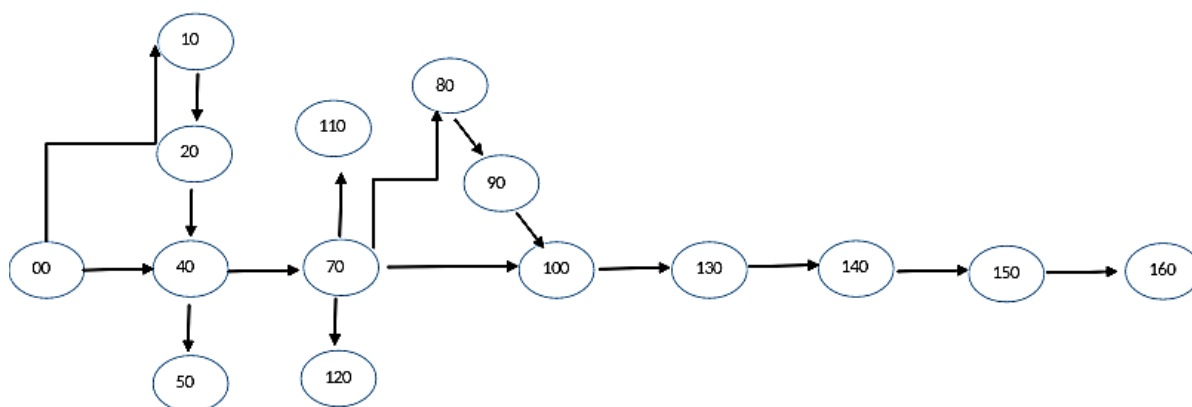
- Torres , C., & Zarazaga, M. (2007). BLEE en animales y su importancia en la transmisión a humanos. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 29-37. Obtenido de file:///C:/Users/Usuario/Downloads/13112086_S300_es%20(1).pdf
- Vera, J. (Abril de 2017). *Actualidad Avipecuaria*. Obtenido de <http://www.actualidadavipecuaria.com/noticias/peru-es-el-cuarto-consumidor-de-pollo-en-america-latina.html>
- Wang, J., Stephan, R., Power, K., Yan, Q., Hachler, H., & Fanning, S. (11 de June de 2014). Nucleotide sequences of 16 transmissible plasmids identified in nine multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates expressing an ESBL phenotype isolated from food-producing animals and healthy humans. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 69, 2668. doi:10.1093/jac/dku206

XV. PARTE COMPLEMENTARIA

15.1 CRONOGRAMA

Fases	Actividad	Código	días	Diciembre					Enero					Febrero					Marzo					Abril					Mayo			
				5	10	15	20	25	30	5	10	15	20	25	30	5	10	15	20	25	30	5	10	15	20	25	30	5	10	15		
fase de preparación del proyecto	Busqueda de cepas E. coli del laboratorio	(00-10)	10	■																												
	Definición de la población de aves existente	(10-20)	15		■																											
	Numeración de empresas y recopilación de datos	(00-40)	30	■	■																											
	Elaboración de data	(20-40)	10			■	■																									
	Organización del muestreo	(40-50)	5					■																								
Fase de ejecución	Estandarización metodo Fenotípico	(40-70)	15					■	■	■																						
	Replicación de cepas	(70-100)	50						■	■	■	■	■	■	■	■																
	Congelamiento de cepas	(70-110)	60							■	■	■	■	■	■	■	■															
	Ejecución de tamizaje metodo fenotípico confirmatorio	(70-120)	65								■	■	■	■	■	■	■															
	Extracción de ADN	(70-80)	15							■																						
	Estandarización metodo genotípico	(80-90)	15									■	■																			
	PCR bla CTX-M	(90-100)	20										■	■																		
	PCR bla SHV	(100-130)	20												■	■	■	■	■													
	PCR bla TEM	(130-140)	20															■	■	■	■	■										
Procesamiento e interpretación de resultados	(140-150)	15																		■	■	■										
Fase Final	Redacción de informe final	(150-160)	15																			■	■	■								

5.2. SECUENCIA DE ACTIVIDADES:



15.3. PRESUPUESTO

15.3.1. Aislamiento e identificación de cepa – Fenotípica

Medios de cultivo y reactivos			Costo S/.	N° Pruebas	Costo/Prueba
Agar	MacConckey	(Merck KGaA)	600	50	12,00

Plastiquería			Costo S/.	N° Pruebas	Costo/Prueba
Placas Petri			300	62	4,80

Equipos		Costo S/.	N° Pruebas	Costo/Prueba	Vida útil (h)
Estufa 37°C –E		6000	7680	0,78	7680
Microscopio –M		2000	7680	0,26	7680
Autoclave-A		2000	7680	0,26	7680
Equipo Baño María BM		9000	7680	1,17	7680
Calibración/mantenimiento E		350	1920	0,18	1920
Calibración/mantenimiento M		350	1920	0,18	1920
Calibración/mantenimiento A		350	1920	0,18	1920
Calibración/mantenimiento BM		350	1920	0,18	1920

Personal		Costo S/.	N° Pruebas	Costo/Prueba	
Analista		0	185	0,00	160
COSTO AISLAMIENTO E IDENTIFICACION			3700,00	20,00	

15.3.2. Aislamiento e identificación de cepa – Genotípica

EXTRACCIÓN DE ADN				
Materiales e insumos				
Reactivos	Costo S/.	N° Pruebas	Costo/Prueba	
Kit Vivantis extraccion ADN (100)	1200	100	12,00	
TE 1X (1L)	265,7	2500	0,11	
Plastiquería	Costo S/.	N° Pruebas	Costo/Prueba	
Tubo de microcentrifuga 1.5mL (1000)	94,4	500	0,19	
Tips sin filtro 200 uL (1000)	52	200	0,26	
Tips sin filtro 1000 uL (1000)	33,1	500	0,07	

Equipos	Costo S/.	N° Pruebas	Costo/Prueba	Vida (h)	util
Micro pipeta 10 uL	678,1	7680	0,09	7680	
Micro pipeta 20 uL	678,1	7680	0,09	7680	
Micro pipeta 200 uL	678,1	7680	0,09	7680	
Equipo Baño Maria BM	9000	7680	1,17	7680	
Micro centrifuga MC	9000	7680	1,17	7680	
Vortex V	4000	7680	0,52	7680	
Calibración 3 micropipetas	1050	960	1,09	960	
Calibración/mantenimiento BM	350	1920	0,18	1920	
Calibración/mantenimiento MC	350	1920	0,18	1920	
Calibración/mantenimiento V	350	1920	0,18	1920	

Electroforesis

Materiales e insumos

Reactivos	Costo S/.	N° Pruebas	Costo/Prueba
Intercalante (Fluorescent) 1mL	350	100	3,50
TBE 10X (1L)	265,7	200	1,33
Agua bidestilada (1L)	7	20	0,35
Agarosa (100g)	650	2000	0,33
MPM Lambda Hind III (50 ug)	364,5	500	0,73

Plastiqueria

	Costo S/.	N° Pruebas	Costo/Prueba
Tubos PCR 0.2 mL (1000)	129,8	1000	0,13
Tips sin filtro 200 uL (1000)	52	500	0,10
Tubo de microcentrifuga 0.6 mL (1000)	94,4	1000	0,09

Equipos	Costo S/.	N° Pruebas	Costo/Prueba	Vida (h)	util
Micropipeta 20 uL	678,1	7680	0,09	7680	
Cámara electroforesis CE	1500	7680	0,20	7680	
Accesorios	600	1920	0,31	1920	
Digitalizador de imágenes DI	32000	15360	2,08	7680	
Fuente de poder FP	6000	7680	0,78	7680	
Mantenimiento/Calibración CE	350	1920	0,18	1920	
Mantenimiento/Calibración DI	350	1920	0,18	1920	
Mantenimiento/Calibración FP	350	1920	0,18	1920	
Calibración 1 micro pipetas	350	960	0,36	960	

PCR – CONVENCIONAL				
Materiales e insumos				
Reactivos	Costo S/.	N° Pruebas	Costo/Prueba	
Master Mix (Thermo Scientific)	512,6	200	2,56	
Agua PCR 1L	464,3	10000	0,05	
Primers o cebadores (2)	300	1000	0,30	

Plastiqueria	Costo S/.	N° Pruebas	Costo/Prueba	
Tubos PCR 0.2 mL	129,8	1000	0,13	
Tips filtro 10 uL	34,9	96	0,36	
Tips filtro 20 uL	34,9	96	0,36	
Tips filtro 100 uL	34,9	96	0,36	
Tubo de microcentrifuga 0.6 mL	94,4	1000	0,09	

Equipos	Costo S/.	N° Pruebas	Costo/Prueba	
Micro pipeta 10 uL	678,1	7680	0,09	7680
Micro pipeta 20 uL	678,1	7680	0,09	7680
Micro pipeta 200 uL	678,1	7680	0,09	7680
Termociclador TC	34000	7680	4,43	7680
Accesorio TC	350	1000	0,35	
Calibración 3 micro pipetas	1050	960	1,09	960
Calibración/mantenimiento TC	1200	1920	0,63	1920

Electroforesis				
Materiales e insumos				
Reactivos	Costo S/.	N° Pruebas	Costo/Prueba	
Intercalante (Fluorescent) 1mL	350	100	3,50	
TBE 10X 1L	265,7	200	1,33	
Agua bidestilada - 1L	7	20	0,35	
Agarosa 100g	650	2000	0,33	
MPM 100 bp (50 ug)	364,5	500	0,73	

Plastiqueria	Costo S/.	N° Pruebas	Costo/Prueba	
Tubos PCR 0.2 mL	129,8	1000	0,13	
Tips sin filtro 200 uL	52	1000	0,05	
Tubo de micro centrifuga 0.6 mL	94,4	1000	0,09	

Equipos	Costo S/.	N° Pruebas	Costo/Prueba	Vida (h)	util
Micro pipeta 20 uL	678,1	7680	0,09		7680
Cámara electroforesis CE		7680	0,20		7680
	1500				
Accesorios	600	1920	0,31		1920
Digitalizador de imágenes DI	32000	15360	2,08		7680
Fuente de poder FP	6000	7680	0,78		7680
Mantenimiento/Calibración CE	350	1920	0,18		1920
Mantenimiento/Calibración DI	350	1920	0,18		1920
Mantenimiento/Calibración FP	350	1920	0,18		1920
Calibración 1 micro pipetas	350	960	0,36		960
Personal	Costo S/.	N° Pruebas	Costo/Prueba		
Analista	0	185	0,00		160
COSTO TOTAL POR PRUEBA		9285,15	50,19		

15.3.3. Cuadro resumen de presupuesto y financiamiento

Etapas	Costo/Prueba	Financiamiento
Aislamiento e identificación microbiológica	20.00	Laboratorio
Detección molecular	50.19	Laboratorio
Costo total/ prueba	70.19	
Costo total por 185 pruebas	13055.34	

XVI. ANEXOS

Anexo 1: Enzimas β LEE descritas en cepas de *Escherichia coli* de origen animal

Tipo animal	de	Año de aislamiento	País	β LEE descritas		
				Tipo CTX-M	Otras β LEE	Combinación de β LEE
Especies destinadas al consumo humano. Animales sanos (muestras fecales)						
Aves		2000-2001	España	CTX-M-14	SHV-12	
		1999-2002	Japón	CTX-M-2, -14		
		2002	China	CTX-M-14		
		2003	España	CTX-M-9, -14	SHV-12	
		2003	España	CTX-M-1, -9, -14, -32	SHV-12, TEM-52	CTX-M-14 + CTX-M-1
						CTX-M-1 + SHV-2
						CTX-M-9 + SHV-5
		2004-2005	China	CTX-M-14, -27		
Cerdos		2002	China	CTX-M-3, -14, -24		
		2003	España	CTX-M-1	SHV-12, SHV-5	
		2005	China	CTX-M-14		
Conejos		2003	España	CTX-M-9, -14		
Vacunos		2000-2001	Japon	CTX-M-2		
		2002	China	CTX-M-13		
		2004	Dinamarca		TEM-52	
		2004-2005	Reino Unido	CTX-M		
Especies destinadas al consumo humano. Animales enfermos (muestras clínicas)						
Aves		2003	España	CTX-M-9, -14	SHV-12	
		2003-2004	Francia	CTX-M-1		
		2005	China	CTX-M-14		
Cerdos		2003	España	CTX-M-14, -32	SHV-12	
		2000-2004	Francia	CTX-M-1		

	2005	China	CTX-M-14		
Conejos	2003	España		TEM-52	
Vacunos	2003	España	CTX-M-1		
	2004	Francia	CTX-M-1, -15		
	2004	Reino Unido	CTX-M-14		
	2004-2005	Reino Unido	CTX-M-14		
Animales no destinados al consumo humano					
Animales de compañía sanos	2001-2003	Italia	CTX-M-1		
	2003	Portugal	CTX-M-1	TEM-52	
Animales de compañía enfermos	1998	España		SHV-12	
	2001-2003	Italia	CTX-M-1	SHV-12	CTX-M-1 + SHV-12
Animales salvajes	2003-2004	Portugal	CTX-M-1, -14	SHV-12, TEM-52	CTX-M-14 + TEM-52

Fuente: (Torres & Zarazaga, BLEE en animales y su importancia en la transmisión a humanos, 2007)

Anexo 2: Operacionalización de las variables

Variables	Definición Conceptual	Definición Operacional	Dimensiones	Indicadores
Variables Principales				
Presencia de β LEE fenotípico	Dependiente cualitativa nominal dicotómica	Diagnóstico confirmatorio mediante técnicas específicas	Si / No	confirmación laboratorio
Presencia de β LEE genotípico	Interviniente cualitativa nominal dicotómica	Diagnóstico confirmatorio mediante técnicas específicas	Si / No	confirmación laboratorio
Sensibilidad/resistencia Antimicrobianos	Dependiente cualitativa nominal	Reporte de aves fueron sometidas al uso de antimicrobianos	Sensible, intermedio, resistente	confirmación laboratorio
Variables Secundarias				
Especie	cualitativa nominal	Especie de ave	pollos gallinas	Ficha de recolección de datos
Edad	cuantitativa discontinua	Edad en días	1, 2, 3, 4, 5,... días	pirámide etaria
Raza	cualitativa nominal	Características fenotípicas del ave producción de carne, huevo, genética.	Broiler, postura, reproductor, otro.	% de aves con diferentes propósitos
Sexo	cualitativa nominal dicotómica	Género perteneciente al ave	Hembra, Macho	Ficha de recolección de datos
Grado de confinamiento	dependiente ordinal	Nivel de confinamiento de las aves	total, parcial	% del confinamiento permanente
Órganos analizados	cuantitativa nominal	Cantidad de órganos analizados en necropsias por empresa	1, 2, 3, 4, 5,...órganos	% de órganos analizados
Tipo de crianza	cualitativa nominal	Propósito del ave	intensiva o extensiva	Estimado de la prevalencia de la crianza
Departamento	dependiente nominal	Procedencia del ave, ubicación	Arequipa, Ica, Lima, Trujillo, Ucayali	Ficha de recolección de datos

Anexo 3: Documento de consentimiento informado para participar en el estudio

Nombre de la Tesis: “Detección fenotípica y genotípica de *Escherichia coli* productoras de β -Lactamasas de espectro extendido aisladas de aves de abasto en Perú”

Propósito de la investigación: El actual estudio es un trabajo descriptivo que permitirá conocer el estado de mecanismo de resistencia de cepas aisladas de aves de consumo humano, bajo los siguientes criterios:

1. Detección fenotípica de *Escherichia coli* productoras de enzimas β LEE
2. Caracterización genotípica de *Escherichia coli* productoras de enzimas β LEE
3. Comparación de perfiles sensibilidad/resistencia a antimicrobianos comúnmente utilizados.

Tiempo que tomara la investigación: diciembre 2016 a mayo 2017

Del procedimiento: Se realizarán métodos protocolares método de sinergia de doble disco según el comité de antibiograma de la Sociedad Francesa de Microbiología (detección fenotípica), PCR utilizando cebadores *bla*TEM, *bla*SHV y *bla*CTX-M (detección genotípica)

Beneficio: El laboratorio tendrá derecho a: **en primer lugar**, Ser absuelto de cualquier duda que tenga sobre el presente estudio. **Segundo lugar:** Recibir resultados obtenidos de dicho estudio al concretarse. **Tercer lugar:** Ser atendido personalmente (reclamo o duda referente al estudio) por el investigador principal.

De la compensación económica: No se percibirá ningún estipendio monetario por parte del laboratorio.

Beneficio comunitario: Conocer el estado de existencia de cepas productoras de enzimas β LEE en aves de consumo humano para realizar correctamente actividades de salud pública, y fomentar el control epidemiológico.

Perjuicio: No se estima ningún daño, ya que los datos proporcionados son netamente necesarios para fines de este estudio para los cuales se garantiza absoluta

Certifico con mi firma haber recibido en mis manos el documento de consentimiento informado, y mi participación en el estudio.

Firma del Jefe de laboratorio

XVII. GRÁFICOS

Gráfico 2. Aislamientos de *E. coli* procedentes de las empresas y sucursales ubicadas en los distintos departamentos entre noviembre del 2015 hasta noviembre del 2016

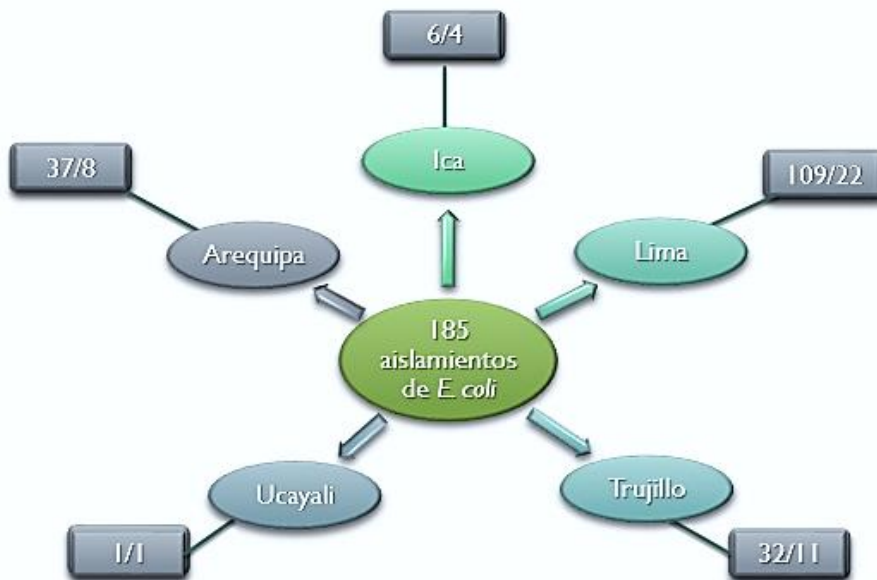


Gráfico 3. Hallazgos porcentuales del antibiograma realizado a los aislamientos de *E. coli* en el Laboratorio de Microbiología de la empresa Bioservice S.R.L entre noviembre del 2015 y noviembre del 2016.

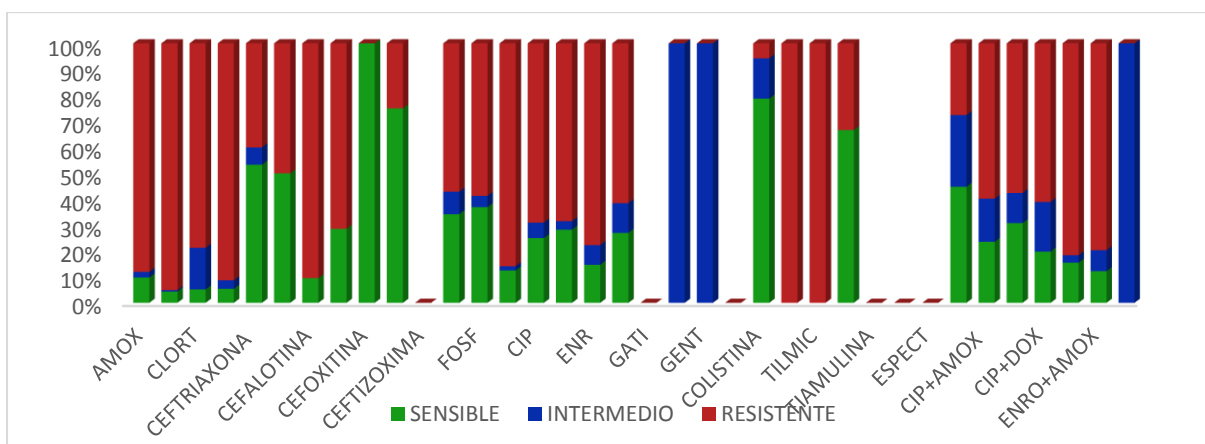


Gráfico 4: Órganos de necropsia analizados que presentaron β -Lactamasas espectro extendido (β LEE) según el método fenotípico confirmatorio

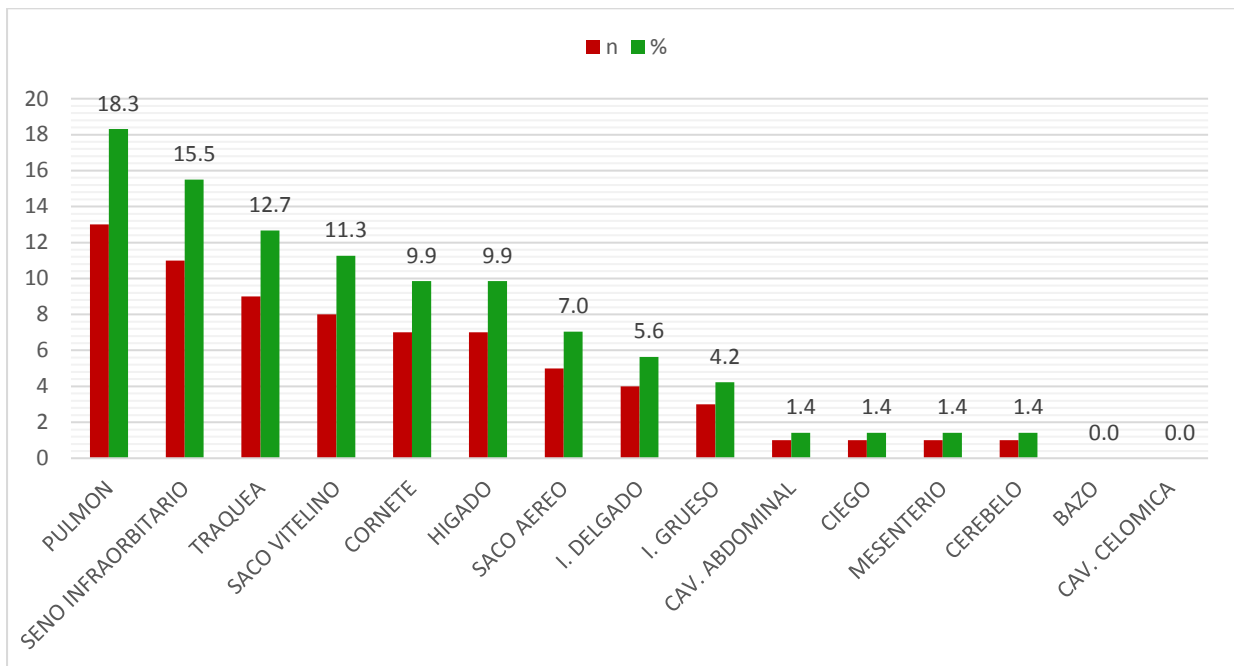


Gráfico 5. Procedencia de aislamientos con cepas β LEE positivas según el método fenotípico confirmatorio

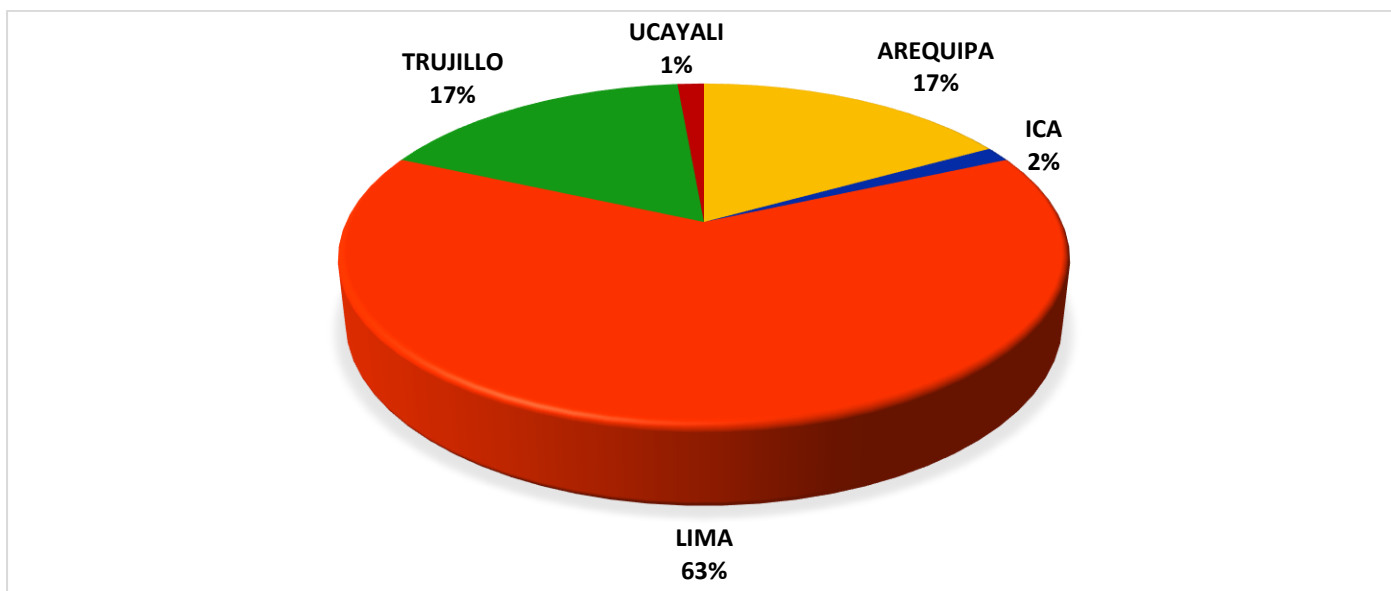


Gráfico 6. Genes *bla* obtenidos de los aislamientos β LEE positivos según el método fenotípico confirmatorio, por cada empresa y sucursales procedente de los distintos departamentos

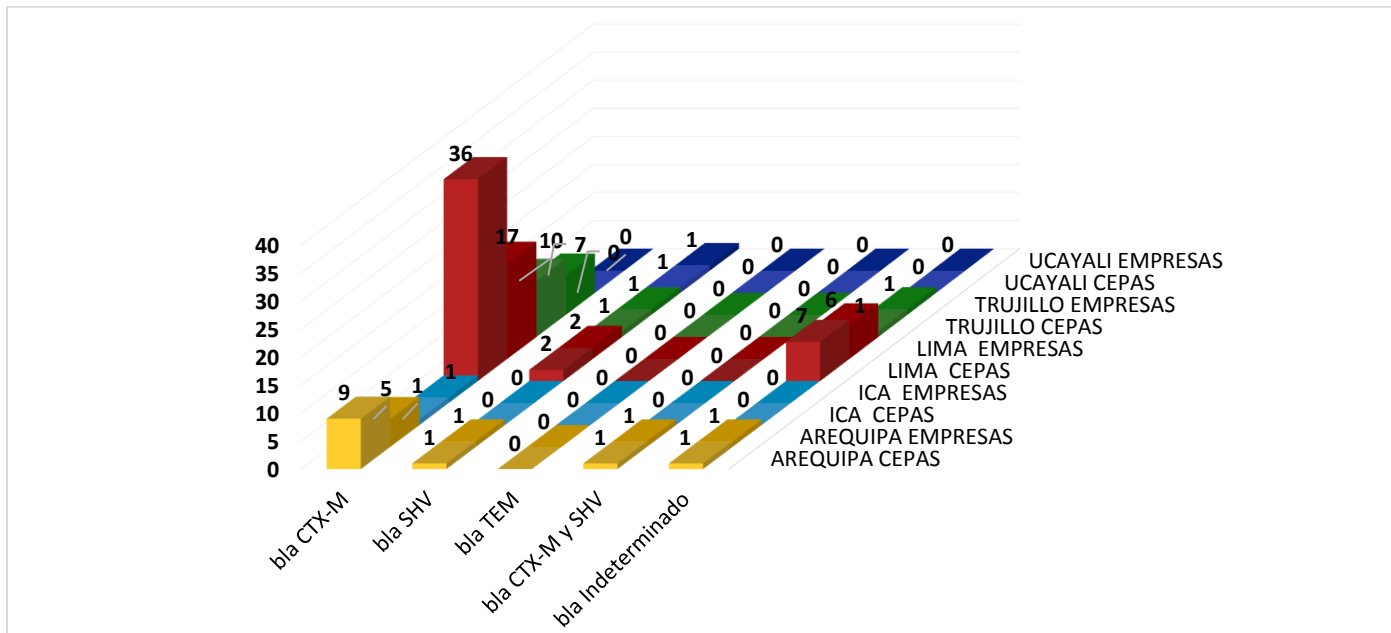


Gráfico 7. Genes *bla* amplificados de los aislamientos β LEE positivos, según el método fenotípico confirmatorio, dividido por cantidad de cepas halladas por cada órgano analizado

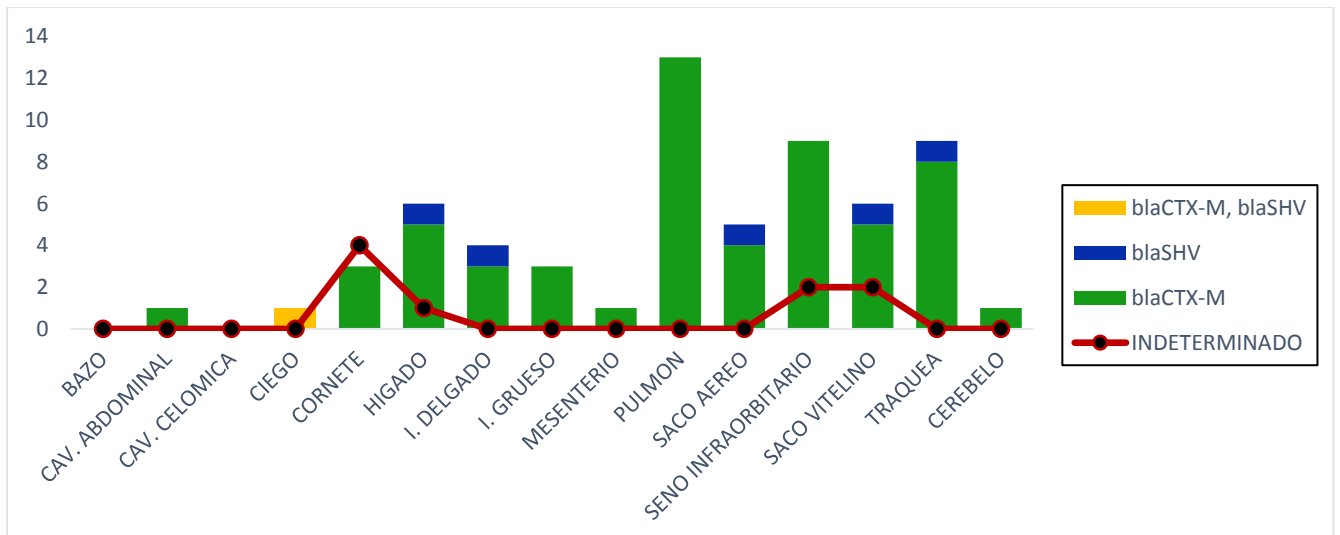


Gráfico 8. Hallazgos porcentuales de los aislamientos βLEE positivos por categorías del antibiograma.

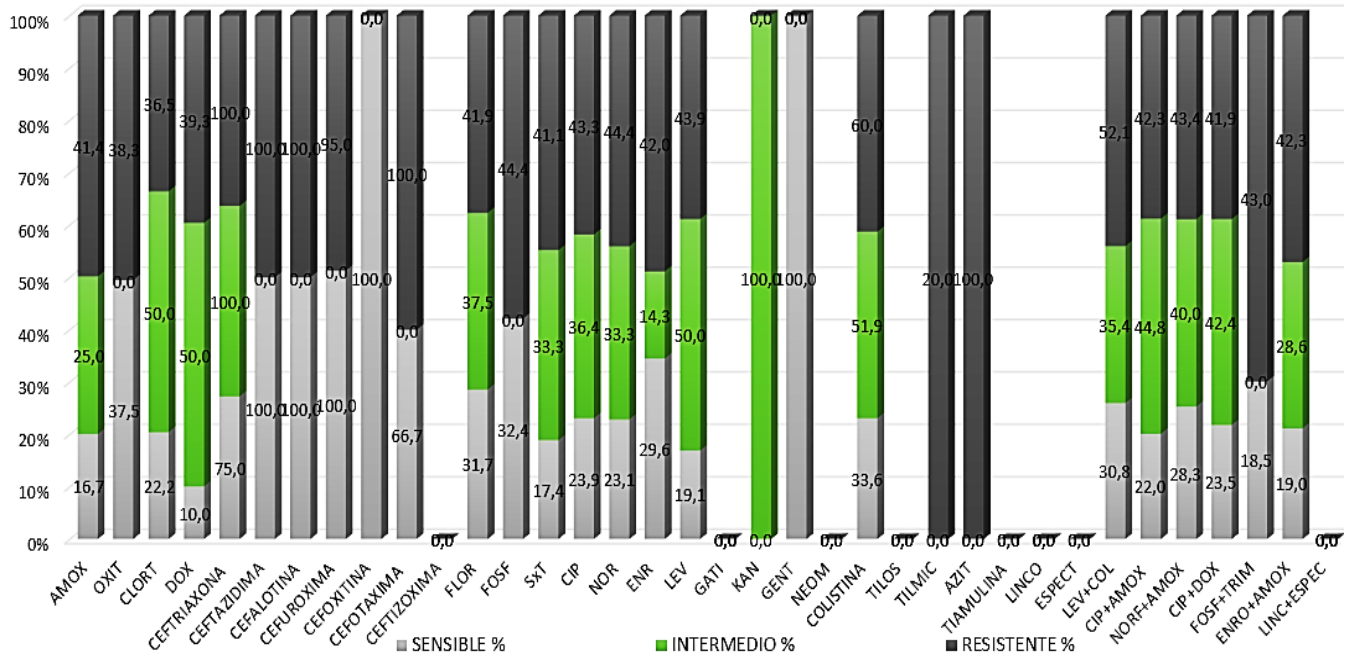


Gráfico 9:

BIOSERVICE
La gota de calidad

INFORME DE ENSAYO N°

EMPRESA:
DIRECCION LEGAL:
CODIGO CLIENTE:
DATOS DE LA MUESTRA:

Muestra	Código Muestra	Granja	Lote	Galpón	Edad

TIPO DE ENSAYO:
METODOLOGIA DE ENSAYO:
LUNULURAS UL MUESTRAS DE LA MUESTRA:
FECHA DE RECEPCION:
FECHA DE ANALISIS:
FECHA DE EMISION:
RESULTADOS :
Diagnóstico:

M.V. Arnaldo Alvarado S.
Jefe de Laboratorio
CMVP 2415

M.V. Daniel Fernández T.
Responsable de Área
CMVP 3842

BIOSERVICE
La gota de calidad

INFORME DE ENSAYO N°

EMPRESA:
DIRECCION LEGAL:
CODIGO CLIENTE:
DATOS DE LA MUESTRA:

Muestras	Código de Muestra	Granja	Lote	Galpón	Linea	Edad	Sexo	Cent. Muestra

TIPO DE ENSAYO:
METODOLOGIA DE ENSAYO:
FECHA DE RECEPCION:
FECHA DE ANALISIS:
FECHA DE EMISION:
RESULTADOS :
Análisis Microbiológico - Aislamiento

Cód. muestra	Organismo	E. coli	Clostridium sp.
Senos infraorbitarios	Ausencia		
Conjuntivas nasales	Ausencia		
Tráquea	Presencia		
Pulmones	Presencia		
Sacos aéreos	Ausencia		
Hígado/hazo	Ausencia		
Intestino Delgado	Presencia	Ausencia	
Ciego	Presencia	Ausencia	

BIOSERVICE
La gota de calidad

TIPO DE ENSAYO: Microbiológico - Prueba de Antibiograma
METODOLOGIA DE ENSAYO:
RESULTADOS :
Muestras: Copia de E. coli
Organos aislados: Tráquea, Pulmones, Intestino Delgado, Ciego.

ANTIBIOGRAMA - TABLA I

Código de Muestra: 1735 001	Halo inh (mm)	Cond
Ciprofloxacina	0	R
Norfloxacina	0	R
Enrofloxacina	0	R
Amoxicilina	0	R
Fluorocinol	0	R
Doxiciclina	0	S
Oxiteciclina	0	R
Fosfomicina sodica	0	R
Sulfametropin	0	R

Cond: Condición: R: Resistente - I: Intermedio - S: Sensible

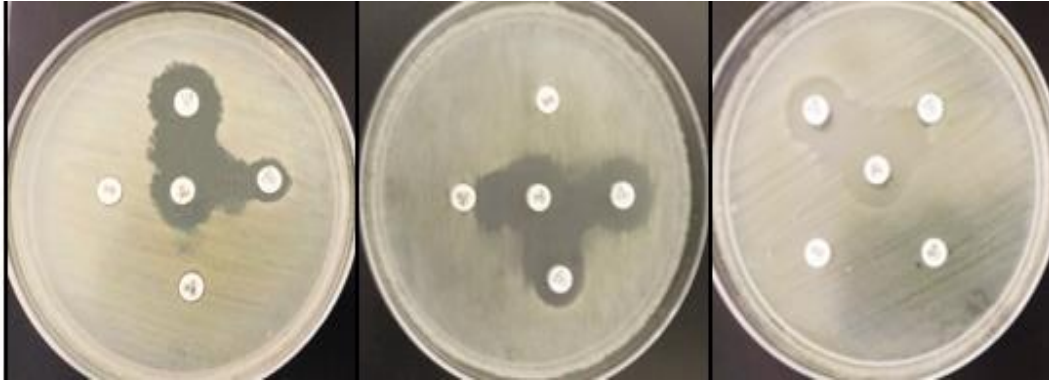
ANTIBIOGRAMA - TABLA II

Código de Muestra: 1735 001	Halo inh (mm)	Cond
Clorotetraciclina	5	R
Levofloxacina	8	R
Sulfato de Colistina	12	S
Levofloxacina + Colistina	14	I
Ciprofloxacina + Amoxicilina	0	R
Norfloxacina + Amoxicilina	9	R
Ciprofloxacina + Doxiciclina	10	R
Fosfomicina + Trimetoprin	0	R
Enrofloxacina + Amoxicilina	0	R

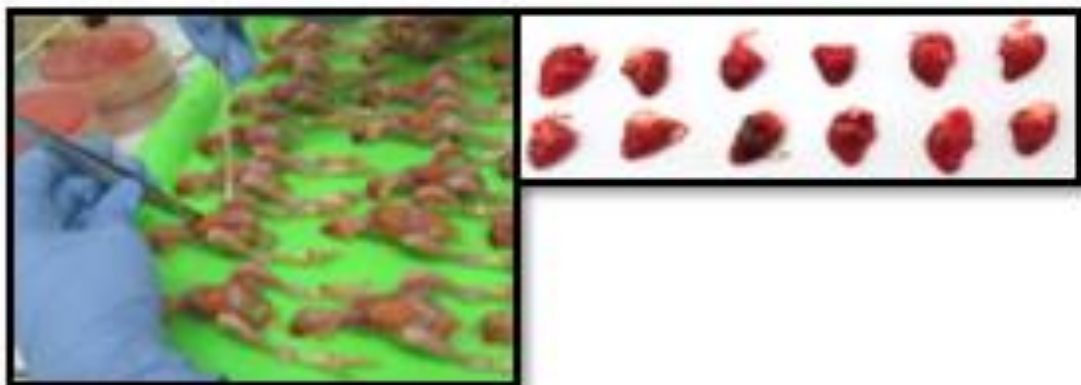
Cond: Condición: R: Resistente - I: Intermedio - S: Sensible

XVIII.FOTOGRAFÍAS:

Fotografía 1: Fichas de recolección de datos de las muestras analizadas en el laboratorio BIOSERVICE S.R.L. entre el año 2015 y 2016



Fotografía 2. Detección fenotípica de enzimas β -Lactamasas de espectro extendido (β LEE) se realizó por el método confirmatorio de sinergia de doble disco según el Comité de Antibiograma de la sociedad Francesa de Microbiología, se evidencia por efecto sinérgico entre el inhibidor y los discos, se presenta la formación de la imagen efecto de huevo, cola de pez o balón de futbol americano.



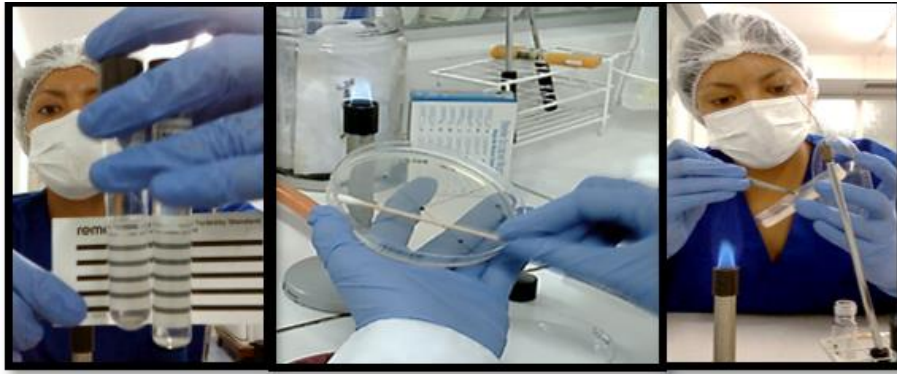
Fotografía 3. (1) Procedimiento de Necropsias y toma de muestras (2) Examen macroscópico de órganos.



Fotografía 4. (1) Materiales para la preparación de agares. (2) Preparación de agares en cámara de flujo laminar



Fotografía 5. (1) Turbidez N.º 0,5 de la escala de Mc Farland (2) Método de siembra con hisopo (3) colocación de los discos antibióticos.



Fotografía 6. (1) Preparación de Tubos con BHI, (2) Tubos con las colonias *E. coli* y BHI (3) Congelación



Fotografía 7. (1) Autoclave (2) Desecho de residuos



Fotografía 8. Extracción de ADN bacteriano utilizando GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit.



XIX. RESULTADO DE PCR

ADN N°	Gen	Tamaño Amplicón (Pares De Base)	PCR
EC-001	<i>bla</i> CTX-M-1	544	-
EC-002	<i>bla</i> CTX-M-1	544	+

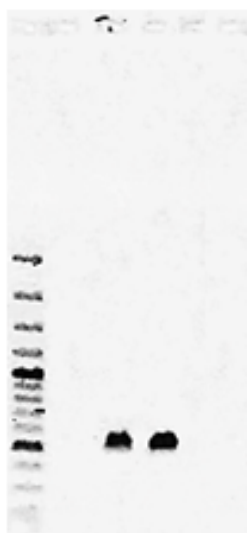


Figura 9. Diagnóstico molecular de gen *bla*CTX-M-1 (β LEE)

M, Marcador de peso molecular 100pb Plus DNA Ladder (GeneON), Línea 1, EC-001, Línea 2, EC-002, Línea 3, Control positivo *bla*CTX-M-1, Línea 5, Control Negativo, Línea 6, Blanco PCR.

ADN N°	Gen	Tamaño Amplicón (Pares De Base)	PCR
EC-001	<i>blaSHV</i>	861	+

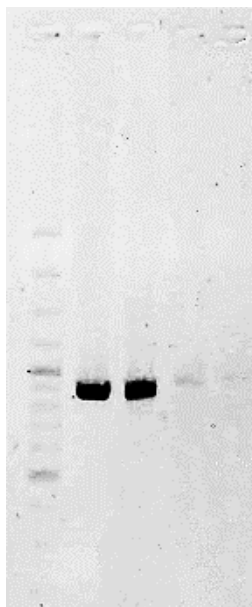


Figura 10. Diagnóstico molecular de gen *blaSHV* (β LEE)

M, Marcador de peso molecular 100pb Plus DNA Ladder (GeneON), Línea 1, EC-001, Línea 2, Control positivo *blaSHV*, Línea 3, Control Negativo, Línea 4, Blanco PCR.

XX. DOCUMENTOS

Anexo 4: Carta de presentación de la Universidad Ricardo Palma.

20. DOCUMENTOS

Anexo 4: Carta de presentación de la Universidad Ricardo Palma.

CARGO

Surco, 13 de diciembre de 2016

Doctor
ROBERT TINOCO ROMERO
Gerente General
Laboratorios BIOSERVICE
Presente.

De mi mayor consideración:

Tengo el agrado de dirigirme a usted, para expresarle mi saludo y a la vez presentarle a la Seta. **NATHALY ROSSEMERY PEÑA MURILLO**, (código 201012013), estudiante del último ciclo de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma, quien realizará su proyecto de tesis con el tema "*Detección de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en pollos*".

Ante lo expuesto solicitamos a su Despacho tenga a bien permitirle el uso del material que requiera para continuar con su tema de investigación, dentro del periodo que usted estime pertinente.

Agradeciéndole la atención que le merezca el presente, hago propicia la oportunidad para hacerle llegar mis cordiales saludos.

Atentamente,

 UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
Facultad de Ciencias Biológicas
E.A.F. de Ciencias Veterinarias

M.V. Nela GUZMÁN ALEUCIA PUENTE
DIRECTOR


GLP/ep

cc. **Dr. Arnaldo Altamirano Sánchez**
Archivo


M.V. Arnaldo Altamirano Sánchez
JEFE de Laboratorio
BIOSERVICE S.R.L.
C.N.V.P. - Nº 2615

RECIBIDO
Bioservice S.R.L.

Fecha: 13, 12, 2016


Anexo 5: Carta de respuesta del laboratorio Bioservice SRL emitida por el Gerente General



Anexo 5: Carta de respuesta del laboratorio Bioservice SRL emitida por el Gerente General.

Lima, 16 diciembre del 2016

Dr. Guillermo Leguía Puentes

Director Escuela Académico Profesional de Ciencias Veterinarias

S.D.

Tengo el agrado de dirigirme a usted, para expresarle mis saludos y a la vez informarle que el proyecto de tesis titulado "Detección fenotípica y genotípica de *Escherichia coli* productora de B-lactamasas de espectro extendido aisladas de aves de abasto en Perú" presentado por la estudiante Srta. Nathaly Rossemery Peña Murillo ha sido aprobado por la Gerencia de Bioservice SRL para su desarrollo consignándole el código interno 001-2017, así como la designación de responsables del desarrollo del proyecto de tesis al Jefe de Investigación y Desarrollo, Dr. Jorge Rodríguez y al Jefe de Laboratorio, Dr. Arnaldo Alvarado. Ambos profesionales, médicos veterinarios, coordinarán con la Srta. Peña la disponibilidad de material biológico y de laboratorio necesario para la realización de su investigación en las instalaciones de Bioservice SRL.

Hago propicia la ocasión para expresarle mis cordiales saludos y estima personal.

Atentamente,

Dr. Robert Tinoco

Gerente General

cc. Jorge Rodríguez

Arnaldo Alvarado

Nathaly Peña