



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

**Detección de β -lactamasas de espectro extendido
(BLEE) en *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.* aislados de
perros**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Melanie Katiushka Andrea PERALES GUERRERO

ASESOR

Sonia Yenny CALLE ESPINOZA DE CAMACHO

Lima, Perú

2024



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Perales M. Detección de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. aislados de perros [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2024.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Melanie Katiushka Andrea Perales Guerrero
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	71260394
URL de ORCID	https://orcid.org/0009-0003-4632-9610
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Sonia Yenny Calle Espinoza De Camacho
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	10321145
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-4955-2378
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Raúl Hector Rosadio Alcántara
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08661836
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Viviana Rosa Fernández Paredes
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09801890
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Joel André Palomino Farfán
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	46238101

Datos de investigación	
Línea de investigación	B.2.8.3. Resistencia Bacteriana
Grupo de investigación	Microbiología aplicada a la salud públicaanimal y de impacto ambiental (MASPAIA)
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Programa de Promoción de Tesis de Pregrado. PCONFIGI A21080451.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: San Borja Latitud: -12.0815915 Longitud: -76.9877331
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2022-2024
URL de disciplinas OCDE	Microbiología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01 Genética https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.07



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS EN MODALIDAD VIRTUAL
PARA OPTAR EL TÍTULO DE MEDICO VETERINARIO
Autorizado por R.D N° 304-D-FMV-2020**

1. FECHA DE LA SUSTENTACIÓN 11/11/2024

HORA INICIO: 11:00 am.

HORA TÉRMINO: 13:00.

2. MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTE: **MV. PhD. ROSADIO ALCÁNTARA RAUL HECTOR**

MIEMBRO: **MV. FERNÁNDEZ PAREDES VIVIANA ROSA**

MIEMBRO: **MV. Mg. PALOMINO FARFÁN JOEL ANDRÉ**

ASESORA: **Blga. Mg. CALLE ESPINOZA SONIA YENNY**

3. DATOS DEL TESISISTA

APELLIDOS Y NOMBRES: **PERALES GUERRERO MELANIE KATIUSHKA ANDREA**

CÓDIGO: 15080009

R.R. DE GRADO DE TESISISTA NÚMERO: **N°001321-2023-R/UNMSM**

TÍTULO DE LA TESIS: **“DETECCIÓN DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) EN *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. AISLADOS DE PERROS”**

4. RECOMENDACIONES

Datos de la plataforma virtual institucional del acto de sustentación:

https: meet.google.com/tqo-mrfe-nuy

ID: tqo-mrfe-nuy

Grabación archivada en:

<https://drive.google.com/file/d/1yEmD1pSplQaYKKJkDM4Pv81DPeBuAel/view?usp=sharing>

5. NOTA OBTENIDA: 17 diecisiete

6. PÚBLICO ASISTENTE: (Nombre, apellido y DNI)

TESISTA	1	PERALES GUERRERO MELANIE KATIUSHKA ANDREA	-	melgatiuska@gmail.com
JURADO	2	ROSADIO ALCÁNTARA RAUL HECTOR	08661836	rrosadioa@unmsm.edu.pe
	3	FERNÁNDEZ PAREDES VIVIANA ROSA	09801890	vfernandezp@unmsm.edu.pe
	4	PALOMINO FARFÁN JOEL ANDRÉ	46238101	jpalominof@unmsm.edu.pe
	5	CALLE ESPINOZA SONIA YENNY	10321145	scallee@unmsm.edu.pe
COMITÉ DE SUSTENTACIONES	7	LUIS HOYOS SIFUENTES	41175479	luis.hoyos@unmsm.edu.pe
SOLICITUD DE ASISTENCIA ESTUDIANTES	1	Estefany Doroty Hurtado Lozano	74599702	estefanyhulo@gmail.com
	2	Luis Guillermo Alvarez Vega	71419745	alvarezvega.luisguillermo@gmail.com

7. FIRMAS DE LOS MIEMBROS DEL JURADO

 Firmado digitalmente por ROSADIO ALCANTARA Raul Hector FAU 20148092262 soft Motivo: Soy el autor del documento Fecha: 06.12.2024 16:39:46 -05:00	
Firma	
MV. PhD. ROSADIO ALCÁNTARA RAUL HECTOR	
Apellidos y Nombres	
PRESIDENTE	

 Firmado digitalmente por CALLE ESPINOZA DE CAMACHO Sonia Yenny FAU 20148092282 soft Motivo: Soy el autor del documento Fecha: 10.12.2024 16:29:01 -05:00 Firma	 Firma	 Firmado digitalmente por PALOMINO FARFAN Joel Andre FAU 20148092282 soft Motivo: Soy el autor del documento Fecha: 10.12.2024 15:57:39 -05:00 Firma
Blga. Mg. CALLE ESPINOZA SONIA YENNY Apellidos y Nombres	MV. FERNÁNDEZ PAREDES VIVIANA ROSA Apellidos y Nombres	MV. Mg. PALOMINO FARFÁN JOEL ANDRÉ Apellidos y Nombres
ASESORA DE LA TESIS	MIEMBRO JURADO	MIEMBRO JURADO



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo Calle Espinoza, Sonia Yenny en mi condición de asesor acreditado con la Resolución Directoral N° 0137-EPMV/FMV-2023 de la tesis, cuyo título es **“Detección de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. aislados de perros y gatos”**, presentado por el bachiller **PERALES GUERRERO MELANIE KATIUSHKA ANDREA** para optar el título profesional de Médico Veterinario,

CERTIFICO QUE

Habiendo cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de 9 % de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su publicación **en el repositorio institucional.**

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del título profesional correspondiente.



Firmado digitalmente por CALLE
ESPINOZA DE CAMACHO Sonia
Yenny FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 18.09.2024 13:12:11 -05:00

Sonia Calle Espinoza
Profesora Principal a DE
DNI: 10321145

DEDICATORIA

A Dios, por permitirme haber concluido mi carrera, derramar su bendición sobre mí y brindarme su fuerza para superar todos los obstáculos.

A mi madre, pues sin ella no hubiera logrado nada, por su entrega y dedicación total a sus hijos y por enseñarme a nunca rendirme aún en momentos difíciles.

A mi padre, por su amor incondicional y motivación constante para alcanzar mis metas.

A mi hermano, por ser ejemplo de resiliencia e inspirarme a cumplir mis sueños.

A mi abuelo Pedro, por su gran apoyo a lo largo de mi vida, por su sabiduría y por enseñarme el verdadero valor del amor y la generosidad.

A Miguel, por sus palabras de aliento cada vez que dudaba de mí misma, por impulsarme a lograr mis objetivos y por ser mi mayor soporte emocional, pareja y mejor amigo.

Y a mis ángeles en el cielo, Aldair y Leonel.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, Blga. Mg. Sonia Calle por otorgarme la oportunidad y confianza para desarrollar esta tesis de manera satisfactoria.

Al Dr. Juan Siuce, por estar siempre dispuesto en absolver mis dudas y ayudarme en la elaboración de esta tesis.

Al Dr. Joel P. y al Dr Luis A., por enseñarme con mucha paciencia todos los procesos realizados en esta tesis, y por todo el apoyo que me brindaron en cada etapa.

A mis compañeros, Emelin y Jhoncito por enseñarme los tips para realizar mejor mi PCR, y por ayudarme los días que nos quedábamos hasta muy tarde realizando nuestras electroforesis.

A mis gati-compañeros de cuatro patas, Sombrita y Omicron, les agradezco la motivación que me dan de seguir adelante, y por ser fuente infinita de amor, lealtad, felicidad y maullidos.

ÍNDICE

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
ÍNDICE.....	III
RESUMEN	V
ABSTRACT.....	VI
LISTA DE CUADROS	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE ANEXOS	IX
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. <i>ENTEROBACTERIACEAE</i>	3
2.1.1. GÉNERO <i>Klebsiella</i> spp.....	4
2.1.2. GÉNERO <i>Escherichia</i>	7
2.2. ANTIBIÓTICOS B-LACTÁMICOS	9
2.3 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA	11
2.3.1 DEFINICIÓN.....	11
2.3.2 TIPOS DE RESISTENCIA.....	11
2.4.1. MECANISMO DE RESISTENCIA A BETALACTÁMICOS.....	12
2.4.1.1 MODIFICACIONES DEL SITIO DIANA:	12
2.4.1.2. BOMBAS DE EFLUJO:.....	12
2.4.1.3. ALTERACIÓN DE LA PERMEABILIDAD DE MEMBRANA:.....	12
2.4.1.4. INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA:	12
2.5. BETALACTAMASAS	13
2.6. BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE).....	15
2.6.1. TIPOS DE BLEE	16
2.6.1.1. TEM	16
2.6.1.2. SHV	16
2.6.1.3. CTX-M	17
2.6.1.4. OTRAS BLEE	17
2.7. DETECCIÓN DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO.....	18

2.7.1. PRUEBAS DE SCREENING PARA LA PRODUCCIÓN DE BLEE	18
2.7.1.1. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO.....	18
2.7.1.2. PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR DILUCIÓN	19
2.7.2. PRUEBAS FENOTÍPICAS CONFIRMATORIAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BLEE .	19
2.7.2.1. MÉTODO DE SINERGIA DE DOBLE DISCO O MÉTODO DE JARLIER	19
2.7.2.2. MÉTODO DE DISCOS COMBINADOS (CEFALOSPORINA/CLAVULANATO)	19
2.7.3. PRUEBAS MOLECULARES	19
2.7.3.1. AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN <i>bla</i>	19
2.8. ANTECEDENTES	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN Y TIEMPO	23
3.2. DESCRIPCIÓN DEL MATERIAL EXPERIMENTAL.....	23
3.2.1. MUESTRAS BIOLÓGICAS	23
3.2.2. MATERIALES	23
3.2.3. EQUIPOS.....	24
3.2.4. REACTIVOS	24
3.3. DESCRIPCIÓN DEL DISEÑO EXPERIMENTAL.....	25
3.3.1. REACTIVACIÓN DE CEPAS	25
3.3.2. DETECCIÓN FENOTÍPICA CONFIRMATORIA DE BLEE.....	25
3.3.3. DETECCIÓN GENOTÍPICA DE BLEE	25
3.3.3.1. EXTRACCIÓN DE ADN	25
3.3.3.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	26
3.3.3.2.1. PCR PARA EL GEN <i>bla_{TEM}</i>	26
3.3.3.2.2. PCR PARA EL GEN <i>bla_{SHV}</i>	27
3.3.3.2.3. PCR PARA EL GEN <i>bla_{CTX-M}</i>	28
3.3.4. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	28
IV. RESULTADOS	29
V. DISCUSIÓN	34
VI. CONCLUSIONES	40
VII. LITERATURA CITADA.....	41
ANEXOS.....	54

RESUMEN

La resistencia antimicrobiana se ha convertido en un problema de preocupación mundial debido al surgimiento y diseminación de patógenos multirresistentes (MDR), como las enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), bacterias resistentes a las cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos. Debido al estrecho contacto entre propietarios y mascotas durante los últimos años, los animales de compañía representan potenciales fuentes de transmisión de estos patógenos. El objetivo de esta investigación es detectar fenotípica y genotípicamente betalactamasas de espectro extendido en aislados de *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. provenientes de muestras de perros en Lima-Perú. Las cepas aisladas para la detección de BLEE fueron 27 *E. coli* y 14 *Klebsiella* spp. Para la detección fenotípica se usó el método americano propuesto por la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), método de difusión de disco, usando discos de ceftazidima, cefotaxima, ceftazidima + ácido clavulánico (CAZ/CLA 30/10 µg) y cefotaxima + ácido clavulánico (CTX/CLA 30/10 µg), incubadas a 37° C durante 24 horas. Considerando positivas a aquellas cuyo halo de inhibición sea mayor o igual a 5 mm entre CTX frente a CTX/CLA y/o CAZ frente a CAZ/CLA. Para la detección genotípica, previamente se realizó la extracción de ADN según las instrucciones del fabricante del Kit GenJet (ThermoFisher), posteriormente se realizó un PCR para amplificar los genes *bla*_{CTX-M} (585 pb), *bla*_{SHV} (854 pb) y *bla*_{TEM} (859 pb), los productos fueron examinados mediante un transiluminador de luz azul. Fenotípicamente se encontró una frecuencia de 12% (5/41) de *E. coli* y 10% (4/41) de *Klebsiella* spp. productoras de BLEE. La frecuencia de los genes *bla* en los aislados de *E. coli* fueron de 41% para *bla*_{CTX-M}, 26% para *bla*_{TEM} y 7% para *bla*_{SHV} y la frecuencia de los genes *bla* en los aislados de *Klebsiella* spp. fueron de 43%, 36% y 57% respectivamente. Estos resultados nos demuestran la presencia de enterobacterias productoras de BLEE en animales de compañía, poniéndolos como riesgo potencial de transmisión y reservorios de las mismas.

Palabras clave: Resistencia antimicrobiana, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., betalactamasas de espectro extendido, animales de compañía.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance has become a problem of global concern due to the emergence and spread of multidrug-resistant pathogens, such as extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae, extended-spectrum and monobactam-resistant cephalosporin resistant bacteria. Due to the close contact between owners and pets in recent years, pets represent potential sources of transmission of these pathogens. The objective of this research is to detect phenotypic and genotypically extended-spectrum beta-lactamases in isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. from samples of dogs in Lima-Peru. The strains isolated for the detection of ESBL were 27 *E. coli* and 15 *Klebsiella* spp. For phenotypic detection, the American method proposed by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), disc diffusion method, was used, using ceftazidime, cefotaxime, ceftazidime + clavulanic acid (CAZ/CLA 30/10 µg) and cefotaxime + clavulanic acid (CTX/CLA 30/10 µg), incubated at 37° C for 24 hours. Positive are those whose inhibition halo is greater than or equal to 5 mm between CTX vs. CTX/CLA and/or CAZ vs. CAZ/CLA. For genotypic detection, DNA extraction was previously performed according to the instructions of the GenJet Kit manufacturer (ThermoFisher), then a PCR was performed to amplify the *bla*_{CTX-M} (585 pb), *bla*_{SHV} (854 pb) y *bla*_{TEM} (859 pb) genes, the products were examined using a blue light transilluminator. Phenotypically a frequency of 12% (5/41) of *E. coli* and 10% (4/41) of ESBL-producing *Klebsiella* spp. was found. The frequency of *bla* genes in *E. coli* isolates was 41% for *bla*_{CTX-M}, 26% for *bla*_{TEM} and 7% for *bla*_{SHV} and the frequency of *bla* genes in *Klebsiella* spp. isolates were 43%, 36% and 57% respectively. These results show the presence of ESBL-producing enterobacteriaceae in pets, placing them as a potential risk of transmission and reservoirs of the same.

Keywords: antimicrobial resistance, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., extended-spectrum beta-lactamases, companion animals.

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1.** Características bioquímicas de las especies de *Escherichia* spp.
- Cuadro 2.** Cebadores utilizados para el gen *bla*.
- Cuadro 3.** Concentraciones y volumen de la mezcla final de 20 µL para el gen *bla_{TEM}*
- Cuadro 4.** Concentraciones y volumen de la mezcla final de 20 µL para el gen *bla_{SHV}*
- Cuadro 5.** Concentraciones y volumen de la mezcla final de 20 µL para el gen *bla_{CTX-M}*
- Cuadro 6.** Frecuencia de BLEE según el método de discos combinados
- Cuadro 7.** Frecuencia de gen *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* y *bla_{CTX-M}* mediante PCR.
- Cuadro 8.** Combinaciones de genes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* y *bla_{CTX-M}* en cepas analizadas.
- Cuadro 9.** Frecuencia de los genes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* y *bla_{CTX-M}* en cepas de *Klebsiella* spp.
- Cuadro 10.** Frecuencia de los genes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* y *bla_{CTX-M}* en cepas de *Escherichia coli*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la familia *Enterobacteriaceae* (Puerta y Mateos, 2010).

Figura 2. Representación de los factores de virulencia de *Klebsiella* spp. (Podschun y Ullmann, 1998).

Figura 3. Cepa en estudio de *Klebsiella* spp. sembrado en agar MacConkey luego de 24 horas de incubación.

Figura 4. Estructura química y clasificación de los antibióticos betalactámicos (Suárez y Gudiol, 2009).

Figura 5. Mecanismo de acción de los antibióticos betalactámicos (Suárez y Gudiol, 2009).

Figura 6. Relaciones funcionales y moleculares entre betalactamasas: AV, avibactam; CA, ácido clavulánico; Cb, carbapenem; Cp, cefalosporina; E, cefalosporina de espectro ampliado; M, monobactama; P, penicilina (Bush, 2018).

Figura 7. Electroforesis de productos amplificados para el gen *bla_{TEM}*.

Figura 8. Electroforesis de productos amplificados para el gen *bla_{SHV}*.

Figura 9. Electroforesis de productos amplificados para el gen *bla_{CTX-M}*.

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Lista de cepas utilizadas en el estudio.

Anexo 2: Protocolo para la extracción de ADN en bacterias gramnegativas.

Anexo 3: Resultados fenotípicos de BLEE en todas las cepas del estudio

Anexo 4: Presencia de genes de betalactamasas de espectro extendido (*bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*)

I. INTRODUCCIÓN

La resistencia antimicrobiana (RAM) es producida cuando los microorganismos como las bacterias sufren cambios a lo largo del tiempo que vuelven ineficaces los antimicrobianos usados para combatirlas. Por consiguiente, se define como resistencia antibiótica a la capacidad de la bacteria para sobrevivir al medicamento usado en su terapéutica. La resistencia antibiótica puede ser propia de la bacteria o puede adquirirla en el tiempo (Camacho, 2023).

Debido al surgimiento y alarmante propagación mundial de patógenos multirresistentes (MDR), la resistencia antimicrobiana se ha convertido en un problema prioritario de salud pública cada vez más complejo (OMS, 2016). Actualmente, la OMS ha considerado a las enterobacterias resistentes a las cefalosporinas de tercera generación como *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. como un grupo independiente dentro de los patógenos de prioridad crítica debido a su alta morbimortalidad representando una amenaza a la salud pública (OMS, 2024).

Las enterobacterias son bacilos gramnegativos que pueden ser inmóviles o móviles a través de flagelos peritricos, anaerobios facultativos y no forman esporas (Perez *et al.*, 2014). El principal mecanismo de resistencia de las enterobacterias son la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) confiriéndoles resistencia a la mayoría de los antibióticos betalactámicos, cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos. Las enterobacterias más importantes productoras de BLEE aisladas en animales y humanos son *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. (Álvarez, 2017). Las betalactamasas de espectro extendido son codificadas por genes *bla* (*CTX-M*, *TEM*, *SHV*, entre otros) generalmente se asocian a plásmidos, esta característica extra cromosómica les permite transferir su resistencia antibiótica propagando bacterias multirresistentes. Cabe recalcar, que en los últimos años el gen *bla_{CTX-M}* se ha diseminado de manera rápida posicionándose como el más frecuentemente aislado en animales y humanos

(García *et al.*, 2010). Durante los últimos años se ha hecho más estrecho el contacto de los propietarios hacia los animales de compañía, lo que puede explicar la diseminación de estas enterobacterias productoras de BLEE, encontrándose en Lambayeque-Perú una prevalencia de BLEE de 44,4% en perros sanos (Aguilar-Gamboa *et al.*, 2016). Desde esta perspectiva, los animales de compañía representan un rol muy importante en la transmisión de bacterias resistentes, por lo que resulta determinante su monitoreo en programas de vigilancia epidemiológica (Li *et al.*, 2017).

Pese a que ha aumentado la producción científica en los últimos años sobre la resistencia antibiótica, aún son escasos los estudios enfocados en medicina veterinaria y animales de compañía. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es detectar fenotípica y genotípicamente aislados de *E. coli* y *Klebsiella* spp. productoras de betalactamasas de espectro extendido procedentes de muestras de perros de Lima, Perú.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Enterobacteriaceae*

La familia *Enterobacteriaceae* se encuentra distribuida de manera mundial y es ubicua, pudiéndose encontrar en diversas fuentes ecológicas tales como el agua, suelo, vegetación y animales (Jenkins *et al.*, 2017). Son bacilos gramnegativos, no esporuladas, inmóviles o móviles a través de flagelos peritricos, anaerobios facultativos, catalasa positiva, oxidasa negativa (excepto *Plesiomonas* spp.), reductores de nitrato a nitrito y fermentadores de glucosa (Morales *et al.*, 2019). Se multiplican bien en agar MacConkey y proliferan en medios aerobios y anaerobios (Carrol *et al.*, 2016).

Los miembros de esta familia por lo habitual tienen 0.5 μm de diámetro y de 1 a 3 μm de largo, presentan una envoltura celular compleja caracterizada por ser multilaminar compuesta por la membrana citoplasmática o interna, la membrana externa y el espacio entre ambas membranas denominado periplasma (Martinez, 2023) (Figura 1).

La membrana interna está compuesta de una capa doble de fosfolípidos encargada de regular el flujo de nutrientes. La membrana externa está compuesta también por una bicapa de fosfolípidos y una capa externa que contiene lipopolisacáridos (LPS) siendo este un factor de virulencia importante para las bacterias (Ryan *et al.*, 2017). Estos lipopolisacáridos están formados por un lípido A, un núcleo de oligosacárido fosforilado central y las cadenas laterales de oligosacáridos (Puerta y Mateos, 2010). El espacio periplásmico está compuesto por peptidoglucano y se encarga de darle forma y estabilidad osmótica a las enterobacterias (Puerta y Mateos, 2010).

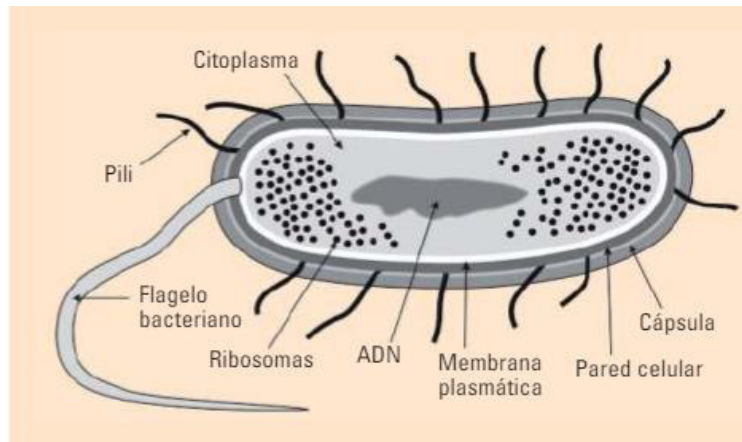


Figura 1. Estructura de la familia *Enterobacteriaceae* (Puerta y Mateos, 2010).

Taxonómicamente, son la única familia dentro del orden Enterobacterales, que pertenece al filo Proteobacteria. Los miembros de esta familia están clasificados en 63 géneros, sin embargo, solo de 20 a 25 miembros tienen importancia clínica (Carrol *et al.*, 2016). Un número considerable de las especies de esta familia viven en el intestino de humanos y animales pudiendo causar enfermedades entéricas o permanecer viviendo como organismos comensales (Morales *et al.*, 2019). Entre las enterobacterias aisladas más frecuentemente en hospitales veterinarios, tenemos a *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. asociadas a enfermedades del tracto urinario y cuadros diarreicos en animales de compañía (García *et al.*, 2019 y Hordijk *et al.*, 2013).

2.1.1. GÉNERO *Klebsiella* spp.

Klebsiella spp. son bacilos anaerobios facultativos, capsulados e inmóviles. Se encuentra de forma ubicua en la naturaleza, en aguas superficiales y residuales, suelos, plantas y en la superficie de las mucosas de humanos y animales (Podschun y Ullmann, 1998). Antes, la clasificación de esta bacteria se basaba en características bioquímicas, actualmente se realiza según la homología del ADN, abarcando una diversidad de especies de *Klebsiella* como *K. michiganensis*, *K. indica*, *K. oxytoca*, *K. spallanzanii*, *K. huaxiensis*, *K. terrigena*, *K. grimontii*, *K. pasteurii* y especies que pertenecen al complejo *K. pneumoniae* (KpSC) (Dong *et al.*, 2022). *K. terrigena*, *K. ornithinolytica*, *K. planticola* y *K. trevisanii* fueron asignados al nuevo género *Raoultella* en el año 2001, anteriormente formaban parte del género *Klebsiella* spp. (Drancourt *et al.*, 2001). Dentro del complejo *K. pneumoniae* (KpSC), se han descrito siete filogrupos hasta el momento: *K. pneumoniae* (Kp1), *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (Kp2), *K. variicola* (Kp3),

K. quasipneumoniae subsp. *similipneumoniae* (Kp4), *K. variicola* subsp. *tropicalensis* (Kp5), *K. quasivariicola* (Kp6) y *K. africanensis* (Kp7) (Håkonsholm et al., 2020 y Rodríguez et al., 2019)

Klebsiella spp. posee una variedad de factores de virulencia que le facilitan infectar al huésped y tolerar su respuesta inmune permitiéndole así ser causante de enfermedades graves. Los factores de virulencia más estudiados de *Klebsiella* spp. la cápsula, los lipopolisacáridos (LPS), las fimbrias y los sideróforos (Herridge et al., 2020) (Figura 2).

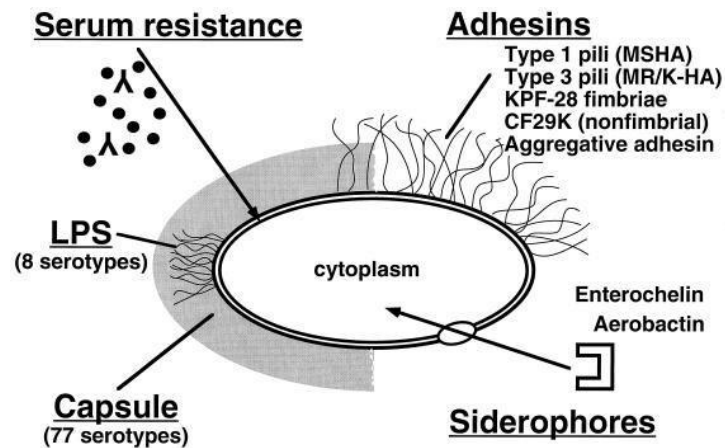


Figura 2. Representación de los factores de virulencia de *Klebsiella* spp. (Podschn y Ullmann, 1998)

Las cepas de *Klebsiella* spp., poseen una cápsula viscosa formada por polisacáridos que cubren la superficie bacteriana formando una estructura gruesa. Los polisacáridos de la cápsula producidos por *Klebsiella* spp. se denominan antígenos K (Clegg y Murphy, 2016 y Herridge et al., 2020). Esta cápsula tiene la función de brindar protección frente a las células fagocíticas del huésped volviéndola más resistente a la fagocitosis, bloqueando así la lisis mediada por el complemento y disminuyendo los niveles de citoquinas proinflamatorias (Herridge et al., 2020).

El lipopolisacárido (LPS) está compuesto por un antígeno O, un núcleo de oligosacárido y lípido A. Es un componente importante de la membrana externa bacteriana y posee propiedades inmunomoduladoras (Lawlor et al., 2005). Tiene como función principal la protección frente a la lisis bacteriana mediante la prevención de la formación del complejo de ataque de membrana C5b-9 del complemento. El lípido A es capaz de bloquear el efecto bactericida de los péptidos antimicrobianos (Riwu et al., 2022)

Klebsiella spp. expresa proyecciones filamentosas no flagelares adhesivas de membrana llamadas fimbrias o pili, están involucradas en la adhesión de la bacteria a la superficie del huésped permitiendo así su invasión (Herridge et al., 2020). Estando dentro del huésped, *Klebsiella* spp. necesita hierro para poder crecer y multiplicarse adecuadamente, por lo que debe

competir con las células del huésped por el hierro. La disponibilidad del hierro en mamíferos es muy poca, debido a lo cual esta bacteria debe expresar sideróforos, moléculas que poseen mayor afinidad por el hierro que las moléculas transportadoras de hierro propia de los mamíferos, como la transferrina. La producción de estas moléculas va a permitir la obtención del hierro por la bacteria y un rápido crecimiento e invasión. El sideróforo de mayor importancia en *Klebsiella* spp. es la enteroquelina, molécula de tipo catecol, conformada por tres anillos fenólicos (Clegg y Murphy, 2016 y Herridge *et al.*, 2020).

Esta bacteria es capaz de crecer en medios de aislamiento ordinarios como agar sangre o agar MacConkey, su incubación requiere 37°C de temperatura durante 24 horas. En agar sangre, luego del periodo de incubación se observan colonias de 2 a 3 milímetros de diámetro, no hemolíticas, viscosas y mucoides. Las colonias mucoides son grandes en forma de cúpula por la gran producción de cápsulas. En agar MacConkey se observan colonias de coloración rosa que fermentan lactosa (Figura 3). Las colonias también se pueden confirmar mediante pruebas bioquímicas en tubos o mediante un sistema comercial (sistema API) (Samanta y Bandyopadhyay, 2020).



Figura 3. Cepa en estudio de *Klebsiella* spp. sembrado en agar MacConkey luego de 24 horas de incubación.

La diferenciación de especies de *Klebsiella* spp. suele identificarse y diferenciarse por reacciones bioquímicas, la mayoría de las especies son indol negativo, excepto *K. oxytoca* única especie productora de indol. Todas las especies de *Klebsiella* spp. son inmóviles, fermentan lactosa, manitol y sacarosa, utilizan citrato como única fuente de carbono, producen lisina descarboxilasa, pero no ornitina descarboxilasa y generalmente son positivas en la prueba de Voges- Proskauer (Podschun y Ullmann, 1998) (Lopardo *et al.*, 2016).

En los últimos años *K. pneumoniae* está tomando mayor importancia como una de los principales agentes causantes de infecciones nosocomiales en humanos, en menor grado también se han aislado *K. oxytoca* (Carrol *et al.*, 2016; Parija, 2012). *K. pneumoniae* es considerado un patógeno oportunista, pudiéndose transmitir de manera asintomática a nivel intestinal, de la piel, nariz y garganta en personas sanas, asimismo puede afectar a pacientes hospitalizados, neonatos e inmunocomprometidos, cursando con infecciones del tracto urinario, infecciones del torrente sanguíneo y neumonía (Holt *et al.*, 2015)

En animales, *K. pneumoniae* causa infecciones como mastitis, neumonía y bacteriemias. Las características epidemiológicas y moleculares de *K. pneumoniae* están muy bien estudiadas en humanos, sin embargo, se sabe poco sobre la población de *K. pneumoniae* en animales (Klaper *et al.*, 2021). En un estudio realizado con aislados de animales y fuentes alimentarias provenientes de animales como cerdos, ganado vacuno y leche, se encontró un 73% de *K. pneumoniae*, un 22% de *K. oxytoca* y 4% de *K. variicola* (Klaper *et al.*, 2021).

2.1.2. GÉNERO *Escherichia*

Escherichia spp son bacilos gramnegativos. Las primeras especies del género *Escherichia* spp. se identificaron mediante perfiles bioquímicos. Leclerc (1962) observó características similares en un grupo de cepas basándose en reacciones de indol, rojo de metilo, citrato y Voges-Proskauer (Cuadro 1). Posteriormente con el desarrollo de nuevas tecnologías de diagnóstico se ha mejorado el proceso de determinación de la taxonomía bacteriana (Yoon *et al.*, 2017). La clasificación en especies del género *Escherichia* spp. se basó en resultados de la hibridación ADN-ADN y análisis de secuenciación del ADNr 16s (Yu *et al.*, 2021).

Se describen cinco especies dentro del género *Escherichia*: *Escherichia coli*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia albertii*, *Escherichia fergusonii* y *Escherichia marmotae*. Estas especies se asocian por el potencial que poseen de desencadenar enfermedades en humanos y animales.

Aunque se ha propuesto reasignar a *E. hermannii* a *Atlantibacter hermannii*, pero no ha sido aprobada de manera formal (van der Putten *et al.*, 2021).

Existen varias cepas de *Escherichia* que no pueden clasificarse dentro de ninguna de las especies ya mencionadas, estas cepas se encuentran en grupos monofiléticos de cepas crípticas distintas de *E. coli* denominados clados crípticos numerados del I al V (Clermont *et al.* 2011)

Cuadro 1. Características bioquímicas de las especies de *Escherichia* spp.

	<i>E. albertii</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. fergusonii</i>	<i>E. hermannii</i>	<i>E. marmotae</i>
ONPG	+	+	+	+	-
Lisina descarboxilasa	+	+	+	-	+
Ornitina descarboxilasa	+	+	+	+	-
Fermentación	Adonitol	-	-	+	-
	D- xilosa	-	+	+	+
	Celobiosa	-	-	+	-
	D-sorbitol	-	+	-	+

Fuente: Van der Putten *et al.*, 2021

Entre las especies de *Escherichia* spp., *E. coli* es la especie más estudiada y la más importante como principal causante de infecciones en humanos y animales (Parija, 2012). Es un bacilo gramnegativo anaerobio facultativo, que se aísla frecuentemente en agar MacConkey o agar con eosina y azul de metileno (EMB), que permiten la diferenciación de enterobacterias según sus características morfológicas y su fermentación a lactosa (Nataro y Kaper, 1998). Es indol positivo, oxidasa negativa y fermentadora de glucosa y lactosa en la mayoría de los casos (Carrasco, 2023). Se encuentra como habitante normal en el tracto intestinal cubriendo las células epiteliales, especialmente a nivel del ciego y el colon del intestino grueso, causando infección cuando el huésped se encuentra inmunodeprimido o debilitado o cuando se traspasan las barreras gastrointestinales. Las infecciones que son causadas por *E. coli* patógena puede estar limitado a las superficies mucosas o diseminarse por todo el cuerpo (Nataro y Kaper, 1998).

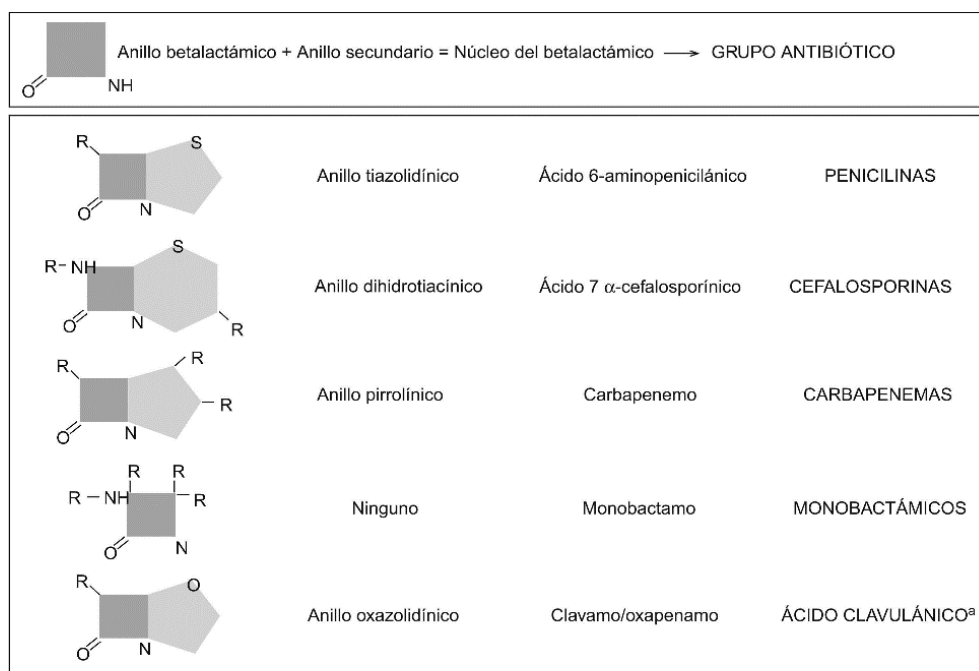
Las cepas de *E. coli* patógenas se dividen en *E. coli* extraintestinal (ExPEC) que ocasionan enfermedades extraintestinales y *E. coli* patógena intestinal, estas se pueden subclasificar según los serotipos, biotipos, patotipos y filogenie . Se han descrito seis patotipos causantes de enfermedades gastrointestinales, como: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica

(ECEH) o productora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC). Las enfermedades extraintestinales más comunes son las infecciones del tracto urinario (ITU) causadas por *E. coli* uropatógena (UPEC) y la meningitis y la sepsis asociado a *E. coli* asociado a meningitis (EMNEC) (Kaper *et al.*, 2004). La ECEH y la EPEC poseen en común las lesiones epiteliales intestinales que ocasionan conocidas lesiones de adhesión y borrado (attaching-and-effacing, en inglés) las cepas causantes de estas lesiones en animales se denominan *E. coli* de adhesión y borrado (AEEC) (Nakazato *et al.*, 2004). Las lesiones son caracterizadas por una íntima unión de la bacteria a la membrana de las células epiteliales intestinales y el borrado de las microvellosidades (Jerse *et al.*, 1990). Esta cepa se ha aislado en perros, gatos, corderos, cerdos, terneros y conejos (Janke *et al.*, 1989). La EPEC se ha descrito como una de las causas principales de diarreas en niños menores de 2 años, a diferencia de individuos más adultos que parecen ser más resistentes a desarrollar enfermedades (Croxen *et al.*, 2013). Por lo que se sugiere que la EPEC en perros podrían representar un problema de salud pública por representar un importante potencial zoonótico (Kjaergaard *et al.*, 2016)

De manera general, los cuadros diarreicos en animales y humanos suelen estar asociados a la infección por uno u otro patotipo de *Escherichia coli*. Entre los patotipos mencionados, la ETEC se encuentra como una de las causas principales de diarrea acuosa grave en algunas especies animales, como terneros recién nacidos lactantes, lechones lactantes y destetados. En el hombre, la ETEC es una de las causas más frecuentes de diarrea infantil en países en vías de desarrollo, y como principal agente causal de la diarrea del viajero (Bouckenooghe *et al.*, 2002). Una de las características generales de la infección por ETEC es la especificidad del huésped, esto es debido a la presencia de receptores específicos de adhesina en una sola especie animal. Por lo que no representan riesgo para el humano y no son consideradas zoonóticas, ya que parecen ser bastantes específicas del huésped. (Nagy y Fekete, 2005)

2.2. ANTIBIÓTICOS B-LACTÁMICOS

Esta familia de antibióticos es de los más recetados en la práctica clínica. Estructuralmente se caracteriza por la presencia de un anillo betalactámico compuesto por un anillo heterocíclico de cuatro átomos, tres de carbono y uno de nitrógeno. Para que este antibiótico sea activo debe unirse a otros radicales (generalmente otros anillos). La presencia de las diferentes cadenas y anillos van a resultar en diferentes clases de antibióticos betalactámicos con propiedades distintas, tales como las penicilinas, cefalosporinas, monobactamas, carbapenémicos e inhibidores de las betalactamasas (Figura 3). Los miembros de esta familia se van a diferenciar por la naturaleza de sus radicales, los cuales van a determinar su mecanismo de acción, su mecanismo de resistencia y su toxicidad (Gómez *et al.*, 2015; Suárez y Gudiol, 2009).



^aTodos los inhibidores de las betalactamasas que se usan en la práctica (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) tienen estructura betalactámica. El sulbactam y el tazobactam son derivados sulfónicos del ácido penicilánico.

Figura 4. Estructura química y clasificación de los antibióticos betalactámicos (Suárez y Gudiol, 2009).

El mecanismo de acción de estos antibióticos consiste en la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana y promoviendo la autólisis de la bacteria. La inhibición de la síntesis de la pared bacteriana se va a dar mediante el impedimento en la síntesis del peptidoglucano, esto sucede durante la última fase de la síntesis de la pared bacteriana llamada transpeptidación, en esta etapa ocurre la pérdida de un aminoácido terminal de los pentapéptidos para formar los tetrapéptidos, esto se va a llevar a cabo por enzimas del espacio periplásmico llamadas transpeptidasas. El anillo betalactámico del antibiótico es parecido estructuralmente a la región de los pentapéptidos donde se unen las transpeptidasas, pudiéndose unir a estas enzimas impidiendo así la formación de la pared bacteriana. Las enzimas transpeptidasas también son llamadas PBP (*penicillin binding protein*). Sin la formación de la pared, la bacteria muere por variaciones en la presión oncótica (Suárez y Gudiol, 2009). Estos antibióticos también van a ejercer acción mediante la activación de autolisinas bacterianas endógenas que van a destruir al peptidoglucano (Suárez y Gudiol, 2009).

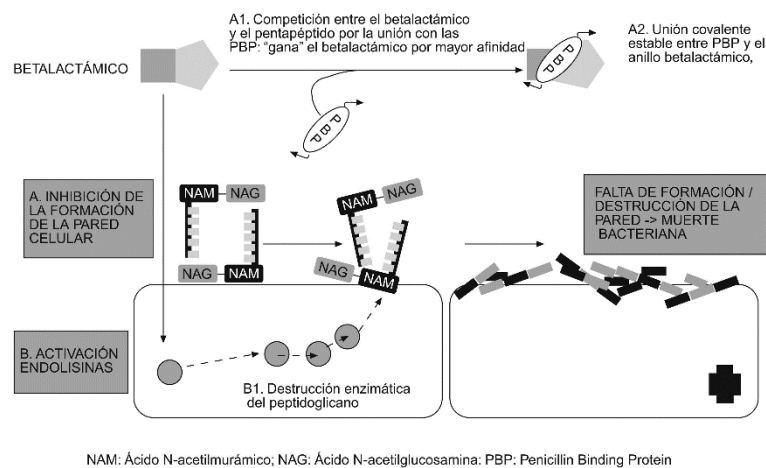


Figura 5. Mecanismo de acción de los antibióticos betalactámicos (Suárez y Gudiol, 2009).

2.3 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

2.3.1 DEFINICIÓN

La resistencia antimicrobiana se da cuando los microorganismos (bacterias, virus, parásitos u hongos) padecen cambios que ocasionan que los medicamentos usados en la terapéutica de infecciones causadas por ellos mismos dejen de ser efectivos. Los microorganismos que confieren resistencia a múltiples antimicrobianos se denominan como ultrarresistentes (Serra, 2017).

2.3.2 TIPOS DE RESISTENCIA

NATURAL O INTRÍNSECA: También conocida como resistencia primaria y se da por alguna característica propia del microorganismo que produce la inactividad del antimicrobiano. Puede deberse a diversos factores como: el fármaco no es capaz de ingresar al microorganismo, La ausencia de la diana o *target* para que el antimicrobiano entre en acción y por la presencia de enzimas que inactivan al antimicrobiano (Bisso-Andrade A, 2018)

ADQUIRIDA: Se conoce también como resistencia secundaria y suele suceder cuando hay antecedentes de haber usado el antibiótico al cual presenta resistencia en algún tratamiento previo (Baene, 1998). Es muy importante ya que implica alteraciones en la carga genética de la bacteria y fenotipos bacterianos, pueden aparecer por mutación cromosómica o por mecanismos de transferencia genética (Bisso-Andrade A, 2018; Daza, 1998).

TRANSMITIDA: Esta resistencia se encuentra mediada por plásmidos, integrones o transposones y pueden transmitir de una bacteria a otra (Bisso-Andrade A, 2018).

2.4. MECANISMOS DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA

Las bacterias se van a volver resistentes impidiendo la acción del antibiótico, se describen múltiples mecanismos de resistencia en las bacterias, entre las más frecuentemente observadas se encuentran los inhibidores enzimáticos, modificaciones de proteínas, alteraciones del sitio diana, bombas de eflujo, entre otras (Kon y Rai, 2016).

2.4.1. MECANISMO DE RESISTENCIA A BETALACTÁMICOS

Los antibióticos betalactámicos han sido de los primeros antimicrobianos usados en la clínica, por lo que la resistencia a estos representa un problema desde hace muchos años. Entre sus mecanismos de resistencia tenemos: la inactivación enzimática, la alteración del sitio receptor (PBPs), reducción de la permeabilidad de membrana y mediante bombas de expulsión. (Martin, 2002)

2.4.1.1 MODIFICACIONES DEL SITIO DIANA:

Las PBP (*penicilin binding protein*) son proteínas importantes en la conformación del peptidoglicano, componente principal de las paredes celulares bacterianas (Kon y Rai, 2016).

Estas proteínas son fijadoras de antibióticos betalactámicos. El efecto de este antibiótico va a depender de la PBP a la que se una, los cambios en la estructura de estas proteínas provocan modificaciones en el sitio activo disminuyendo la sensibilidad hacia los betalactámicos, disminuyendo o perdiendo la afinidad con la proteína objetivo, incrementando así la resistencia (Martin, 2002).

2.4.1.2. BOMBAS DE EFLUJO:

Algunas bacterias van a desarrollar un sistema de bombeo que son capaces de expulsar a los antibióticos desde el interior al exterior de la bacteria (Suárez *et al.*, 2006).

2.4.1.3. ALTERACIÓN DE LA PERMEABILIDAD DE MEMBRANA:

Los betalactámicos son antimicrobianos que necesitan de unas proteínas llamadas porinas que le faciliten la entrada a los microorganismos para poder unirse a su diana, esto se debe a que son sustancias poco lipófilas. Los genes que codifican estas porinas pueden sufrir alteraciones o mutaciones ocasionando porinas modificadas que pueden no ser funcionales o disminuir su expresión, teniendo así bacterias con deficiencia de porinas, significando una baja permeabilidad frente a antibióticos betalactámicos (Suárez *et al.* 2006).

2.4.1.4. INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA:

La producción de enzimas inactivantes es el principal mecanismo de resistencia bacteriana, estas enzimas son capaces de modificar la estructura de los compuestos antimicrobianos. Entre estas enzimas tenemos a las betalactamasas como principal problema, ya que ocasiona la hidrólisis del

anillo betalactámico de estos antibióticos logrando así su inactivación bacteriana (Kon y Rai, 2016).

2.5. BETALACTAMASAS

La hidrólisis de los antibióticos betalactámicos por las betalactamasas es el principal mecanismo de resistencia de esta familia de antibióticos en bacterias gram-negativas de importancia clínica (Bush y Jacoby, 2010).

La clasificación de estas enzimas se realiza por sus características funcionales y basándose en su estructura primaria (Bush y Jacoby, 2010). Bush, Jacoby y Medeiros realizaron su clasificación basándose en una evaluación funcional de estas enzimas, categorizándolas según su eficiencia para hidrolizar sustratos diferentes y su grado de inhibición frente a clavulanato (Medeiros, 1997). Estos parámetros han mostrado demasiada variabilidad. Por consiguiente, un enfoque más sencillo como el propuesto por Ambler basa su clasificación en las secuencias de los nucleótidos que codifican a estas enzimas (Medeiros, 1997).

Dentro de la clasificación de Ambler, se distinguen dos grandes grupos de betalactamasas: las que poseen un resto serina en el sitio activo y las que poseen un átomo de zinc en su sitio activo (Medeiros, 1997). Los miembros de ambas categorías se asignaron dentro de cuatro clases (A, B, C y D), en función de su tamaño molecular y de la homología entre aminoácidos del sitio activo (Bush, 2018). Las enzimas que se encuentran basadas en serina representan tres clases moleculares (A, C y D) y las enzimas basadas en Zinc representan a la clase B o metalo betalactamasas (MBL) (Bush, 2018). Los primeros esquemas de clasificación realizados se basaron en tasas relativas de hidrólisis de las penicilinas y cefalosporinas, junto a la respuesta de las enzimas a los agentes modificadores de proteínas. Cuando se introdujeron nuevos sustratos e inhibidores en la práctica clínica y se volvió más económica y rutinaria la secuenciación de genes, permitió que las características moleculares y funcionales se combinaran para tener un esquema de clasificación más completo, distinguiéndose al menos 17 grupos funcionales (Figura 5) asociados a las cuatro clases moleculares (Bush, 2018).

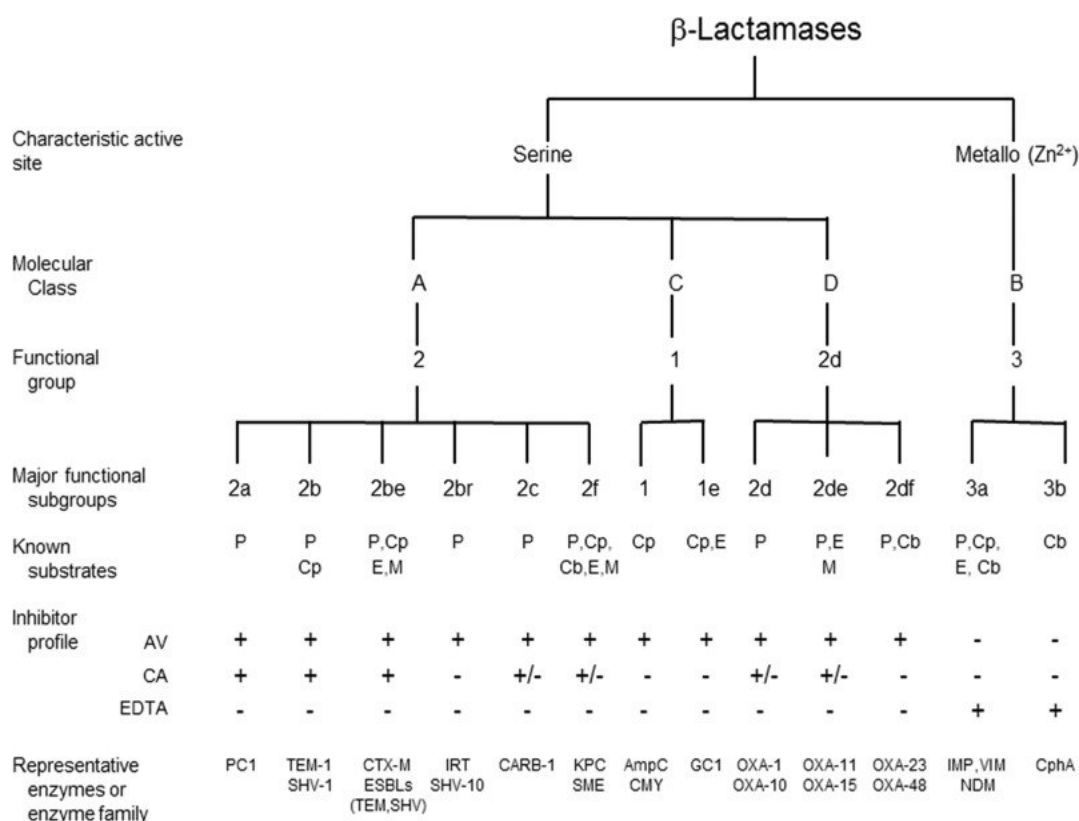


Figura 6. Relaciones funcionales y moleculares entre betalactamasas: AV, avibactam; CA, ácido clavulánico; Cb, carbapenem; Cp, cefalosporina; E, cefalosporina de espectro ampliado; M, monobactama; P, penicilina (Bush, 2018).

Se piensa que las betalactamasas evolucionaron de proteínas de unión a la penicilina, ya que muestran homología en su secuencia. La primera betalactamasa mediada por plásmidos en bacterias gramnegativas fue TEM-1, descrita a principios de los años 1960. Esta enzima fue aislada de una única cepa de *Escherichia coli* proveniente de un hemocultivo de un paciente en Grecia (Bradford, 2001). Con el pasar de los años, TEM-1 se propagó a nivel mundial pudiéndose encontrar en diversas especies de enterobacterias. Otra de las betalactamasas mediada por plásmidos común que se pueden encontrar en enterobacterias como *Klebsiella* spp. y *E. coli* es SHV-1, esta betalactamasa se codifica cromosómicamente en la mayoría de aislados de *K. pneumoniae*, pero de manera general está mediada por plásmidos en *E. coli* (Bradford, 2001).

En las últimas décadas, se han desarrollado nuevos antibióticos betalactámicos diseñados particularmente para no ser hidrolizados por las betalactamasas. No obstante, el desarrollo de cada nueva clase de fármacos ha permitido el surgimiento de nuevas betalactamasas que causan resistencia a estos. El uso exacerbado e inadecuado de estos antibióticos nuevos en la terapéutica ha ocasionado nuevas variantes de β-lactamasas. Una de las nuevas clases de fármacos que se

introdujeron fueron los antibióticos β -lactámicos de espectro expandido como las oximiinocefalosporinas que fueron usadas en el tratamiento de infecciones graves ocasionadas por bacterias gramnegativas durante la década de 1980 (Castanheira et al., 2021). Sin embargo, rápidamente surgieron betalactamasas que fueron capaces de hidrolizarlos, como la SHV-2, que fue encontrada en una cepa de *Klebsiella ozaenae* en Alemania (Kiebe et al., 1985). Ya que estas betalactamasas demostraron un mayor espectro de actividad, particularmente por las oximiinocefalosporinas, estas enzimas fueron denominadas β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Actualmente, se describen más de 150 BLEE distintas (Bradford, 2001).

2.6. BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE)

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) se han vuelto endémicas a nivel mundial. Estas enzimas se caracterizan bioquímicamente porque son capaces de hidrolizar antibióticos betalactámicos de espectro expandido, pero son inhibidas por inhibidores de betalactamasas especialmente el clavulanato (Castanheira et al., 2021). Esta característica le confiere resistencia frente a la mayoría de los antibióticos betalactámicos incluidas las cefalosporinas de espectro expandido y monobactámicos, pero no confiere resistencia a carbapenémicos ni a cefamicinas (Paterson y Bonomo, 2005). Se han descrito betalactamasas de espectro extendido en muchos géneros de enterobacterias (Castanheira et al., 2021).

Este grupo de enzimas son serina betalactamasas y pertenecen a la clasificación molecular y estructural realizada por Ambler como clase A (Castanheira et al., 2021). Las enzimas pertenecientes a esta clase se caracterizan por poseer una serina en el sitio activo y una masa molecular de 29,000 Da aproximadamente e hidrolizan preferentemente penicilinas. En el esquema de clasificación funcional desarrollado por Bush, Jacoby y Medeiros se ubican a las BLEE como grupo 2be manteniendo la definición de las betalactamasas de clase A, que hidrolizan antibióticos betalactámicos de espectro expandido y son inhibidas por todos los inhibidores de betalactamasas antiguos como el clavulanato, tazobactam y sulbactam; hasta por los inhibidores más nuevos como avibactam, vaborbactam y relebactam (Castanheira et al., 2021).

2.6.1. TIPOS DE BLEE

Las propiedades bioquímicas de las BLEE son comunes respecto a la hidrólisis de los antibióticos betalactámicos y a su inhibición por clavulanato. Sin embargo, los genes que codifican a estas enzimas son de origen diverso y pueden agruparse en diversas familias (Bradford, 2001). La mayoría de las betalactamasas de espectro extendido derivan de las enzimas TEM o SHV. Actualmente existen más de 90 betalactamasas tipo TEM y más de 25 enzimas tipo SHV. Estas dos familias de BLEE se pueden encontrar con mayor frecuencia en *Escherichia coli* y *K. pneumoniae*. Mutaciones puntuales en loci específicos dentro del gen puede dar lugar a fenotipos de espectro extendido (Bradford, 2001). Cada familia de las BLEE posee características únicas. Se han clasificado en nueve familias basándose en comparaciones de sus secuencias de aminoácidos, tales como: TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES Y OXA). La familia tipo CTX-M es mucho más diversa genéticamente (Castanheira *et al.*, 2021).

2.6.1.1. TEM

Las betalactamasas de tipo TEM derivan de TEM 1 y 2. TEM-1, este tipo de betalactamasa es la más frecuentemente encontrada en bacterias gramnegativas (Bradford, 2001). TEM-1 se describió por primera vez en el año 1965 de un aislado de *Escherichia coli* proveniente de un paciente llamado Temoneira en Atenas, Grecia. Es por el nombre del paciente que la designación es TEM. TEM-1 puede hidrolizar ampicilina a una mayor tasa que oxacilina, cefalotina o carbenicilina, su actividad contra cefalosporinas de espectro extendido es insignificante y es inhibido por ácido clavulánico (Paterson y Bonomo, 2005). TEM-2 es la primera enzima derivada de TEM-1, teniendo solo un aminoácido sustituido de la enzima original lo que ocasionó un cambio de su punto isoelectrico de 5,4 a 5,6 sin cambiar el perfil del sustrato, manteniendo el mismo perfil hidrolítico que TEM-1 (Jacoby y Medeiros 1991). La primera betalactamasa TEM que mostró el fenotipo BLEE fue TEM-3, esta fue descubierta por primera vez en el año 1984 en una *Klebsiella pneumoniae* en Francia, al principio fue conocida como CTX-1 por su actividad contra la cefotaxima, luego fue denominada TEM-3, diferenciándose de TEM-2 por sus dos sustituciones de aminoácidos (Bradford, 2001; Ghafourian *et al.*, 2015). Hasta la actualidad se describen más de 100 betalactamasas TEM, la mayoría de estas son BLEE. Sus puntos isoelectricos se encuentran entre 5,2 y 6,5 (Paterson y Bonomo, 2005). Las betalactamasas de este tipo se encuentran con mayor frecuencia en *Escherichia coli* y *K. pneumoniae*, también se pueden encontrar en otras especies de bacterias gramnegativas (Bradford, 2001).

2.6.1.2. SHV

Este tipo de betalactamasas se encuentran más en *K. pneumoniae* y es causante de hasta el 20% de resistencia hacia ampicilina mediada por plásmidos en *Klebsiella* spp. (Tzouveleakis y Bonomo, 1999). SHV refiere a la variable sulfhidrilo, y comúnmente están codificadas por

plásmidos multirresistentes autotransmisibles que son altamente móviles (Tzouvelekis y Bonomo, 1999). En Alemania, durante el año 1983, se descubrió un aislado de *Klebsiella ozaenae* que tenía una betalactamasa capaz de hidrolizar la cefotaxima y, en menor medida, ceftazidima. La secuenciación de esta enzima mostró que se diferenciaba de SHV-1 debido a la sustitución de glicina por serina en la posición 238, esta mutación se expresa en las propiedades adquiridas de espectro ampliado de esta betalactamasa, llamada SHV-2. Luego de más de una década de su descubrimiento, se encontraron SHV-2 a lo largo de todo el mundo. Demostrando así que la presión ejercida por el uso de cefalosporinas de tercera generación durante la primera década de su uso fue la responsable de la aparición de esta betalactamasa (Paterson y Bonomo, 2005).

2.6.1.3. CTX-M

Esta betalactamasa fue descrita por primera vez por Tzouvelekis en el año 2000 (Tzouvelekis et al., 2000). Sus siglas se adjudican a la habilidad que posee para hidrolizar cefotaxima (Bonnet, 2004). CTX-M es capaz de hidrolizar mejor la cefalotina que la bencil penicilina e hidrolizar mejor la cefotaxima que la ceftazidima. También se menciona su capacidad de hidrolizar la cefepima. Se inhibe mejor con tazobactam que con clavulanato y sulbactam. Se han descrito tipos de CTX-M clasificándose en cinco grupos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25 (Ghafourian *et al.*, 2015). Curiosamente se encontraron betalactamasas idénticas en lugares muy alejados del mundo, lo que parece indicar una evolución independiente estas enzimas. Se han detectado este tipo de betalactamasas en todos los continentes habitados, incluso en Europa Occidental, América del Norte, China e India, lugares dónde parecían ser poco frecuentes, por lo que se podría especular que este tipo de BLEE actualmente sería la más frecuente en todo el mundo (Paterson y Bonomo, 2005).

2.6.1.4. OTRAS BLEE

Existen otros tipos de BLEE que no se aíslan frecuentemente como las betalactamasas ya mencionadas. La betalactamasa tipo OXA son capaces de hidrolizar la oxacilina y están agrupadas en la clase D según la clasificación de Ambler y en el grupo funcional 2d de la clasificación de Bush-Jacoby-y Medeiros. Este tipo de BLEE se descubrieron en aislados de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de un hospital en Turquía. Las enzimas OXA con fenotipo BLEE están dentro del subgrupo 2de de la clasificación funcional de Bush. La mayoría de este tipo de betalactamasas OXA de espectro extendido derivan de OXA-10 y OXA-2 tales como OXA-11, OXA-13, OXA-14, OXA-16, OXA-17, OXA-18 (Paterson y Bonomo, 2005).

La betalactamasa de tipo GES es el grupo más importante de las BLEE que no son comunes. El gen que codifica GES-1 no está relacionado con ninguna otra enzima betalactamasa mediada por plásmidos. Se aísla más en *P. aeruginosa* y *A. baumannii* (Castanheira *et al.*, 2021).

La betalactamasa tipo VEB-1 (betalactamasa vietnamita de espectro extendido) fue detectada por primera vez en un aislado de *E. coli* que provenía de un bebé vietnamita. Se ha encontrado VEB-1 y otras variantes de este tipo de BLEE (VEB) en cepas gramnegativas (Castanheira *et al.*, 2021).

La betalactamasa tipo PER comparten homología con las de tipo TEM y SHV en un 25 a 27% (Paterson y Bonomo, 2005). PER-1 Y PER-2 son las más comunes dentro de este grupo. PER-1 fue detectado por primera vez en aislados de *Pseudomonas aeruginosa* y luego en aislados de *Salmonella entérica* serovar *Typhimurium* y *Acinetobacter* (Paterson y Bonomo, 2005). PER-1 hidroliza de manera eficaz las penicilinas y cefalosporinas, y es susceptible a la inhibición por ácido clavulánico. Estas enzimas son inhibidas por avibactam en menor medida que las otras betalactamasas de clase A. VEB-1 tiene mayor homología con PER-1 y PER-2 (Ghafourian *et al.*, 2015). Existen otros tipos de BLEE pero sus hallazgos son menos comunes. Las betalactamasas poco comunes incluyen a SFO-1, BES-1, TLA-1, TLA-2 entre otras (Castanheira *et al.*, 2021).

2.7. DETECCIÓN DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO

2.7.1. PRUEBAS DE SCREENING PARA LA PRODUCCIÓN DE BLEE

2.7.1.1. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO

El Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI), propuso métodos de difusión en disco para la detección de productores de BLEE por *Klebsiella* spp., *E. coli* y *Proteus mirabilis* (Paterson y Bonomo, 2005). Usando métodos de difusión en disco para las pruebas de susceptibilidad antibióticas se pueden determinar la producción de BLEE mediante los diámetros de zonas específicas que indicarían una alta sospecha de producción de BLEE (Rawat y Nair, 2010). Se usan discos de cefpodoxima, ceftazidima, aztreonam, cefotaxima o ceftriaxona. Se indica sospecha de producción de BLEE en aislados que muestren resistencia o una disminución de susceptibilidad frente a cualquiera de los cinco agentes ya mencionados (Rawat y Nair, 2010). Se deben realizar pruebas fenotípicas confirmatorias para aquellas cepas sospechosas de ser productoras de BLEE (Paterson y Bonomo, 2005). Inicialmente el CLSI recomendó el diámetro de zona ≤ 22 mm para discos de cefpodoxima de 10 μ g como medida adecuada para detección de BLEE, sin embargo, era inespecífico para detección productoras de BLEE en aislados de

Escherichia coli. Actualmente el CLSI, recomienda los siguientes valores para *E. coli*, *K. oxytoca* y *K. pneumoniae*: cefpodoxima (≤ 17 mm), ceftazidima (≤ 22 mm), ceftriaxona (≤ 25 mm), cefotaxima y aztreonam (≤ 27 mm) (Perez *et al.*, 2007)

2.7.1.2. PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR DILUCIÓN

El CLSI ha propuesto la detección de productores de BLEE por *Klebsiella* spp y *E. coli* mediante métodos de dilución. Pueden usarse ceftazidima, aztreonam, cefotaxima o ceftriaxona a concentración de detección de 1 µg/ml. Un crecimiento mayor o igual a esta concentración es sospechoso de ser productor de BLEE y requerirá de una prueba confirmatoria (Paterson y Bonomo, 2005).

2.7.2. PRUEBAS FENOTÍPICAS CONFIRMATORIAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BLEE

2.7.2.1. MÉTODO DE SINERGIA DE DOBLE DISCO O MÉTODO DE JARLIER

Esta prueba se lleva a cabo en una placa de agar Mueller-Hinton, colocando un disco de susceptibilidad de amoxicilina-ácido clavulánico (AMC) (20 µg/10 µg) en el centro de la placa y alrededor a éste se dispone de discos que contienen de ceftazidima, cefotaxima o ceftriaxona y aztreonam separados de 30 mm entre sí. La zona de inhibición agrandada o distorsionada alrededor del disco de AMC es indicativo de sinergia entre el ácido clavulánico y cualquiera de los antibióticos probados, confirmando así la producción de BLEE (Bradford, 2001). Este efecto sinérgico entre ambos halos también se conoce como efecto cola de pez, efecto huevo o balón de fútbol americano (Lezameta *et al.*, 2010)

2.7.2.2. MÉTODO DE DISCOS COMBINADOS (CEFALOSPORINA/CLAVULANATO)

Para la confirmación de BLEE en *Klebsiella* spp y *E. coli*, se recomienda usar discos de cefotaxima (30 µg) o discos de ceftazidima (30 µg) solos y en combinación con clavulanato (10 µg). El CLSI recomienda que la prueba de discos se realice en agar Mueller-Hinton (Paterson y Bonomo, 2005). La diferencia mayor o igual a 5 mm de los diámetros de zona de cualquiera de los discos de cefalosporinas y su respectivo disco de cefalosporina / clavulanato indicaría una confirmación fenotípica de la producción de BLEE (Lezameta *et al.*, 2010)

2.7.3. PRUEBAS MOLECULARES

2.7.3.1. AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN *bla*

La prueba molecular más común y sencilla para detectar la presencia de una betalactamasa perteneciente al grupo de enzimas es la PCR con cebadores oligonucleotídicos específicos para

el gen de betalactamasa a identificar. La secuenciación posterior de los productos obtenidos en la PCR nos ayudará a saber con exactitud el tipo de enzima BLEE identificada (Bradford, 2001; Seral *et al.*, 2010)

2.8. ANTECEDENTES

La Organización Mundial de la salud (OMS) nos advierte sobre la amenaza creciente que representa la resistencia antimicrobiana (RAM) comprometiendo los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) poniendo en riesgo la salud pública, el crecimiento económico y la seguridad alimentaria. En respuesta a ello, en el año 2017, la OMS publicó una lista de bacterias resistentes a los antimicrobianos categorizadas según prioridad, encontrándose a las bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en la categoría de prioridad crítica, incluyéndose en este grupo a bacterias como *Klebsiella* spp., *E.coli*, *Proteus* spp. , entre otras enterobacterias (OMS, 2017).

Numerosos estudios han reportado aislados bacterianos portadores de BLEE provenientes de muestras fecales de diversos animales que son destinados al consumo humano, animales salvajes y animales de compañía (Li *et al.*, 2007). Las bacterias patógenas provenientes de animales de compañía pueden ser transmitidas hacia los humanos debido al estrecho contacto que existe en la actualidad entre dichas especies (Pomba *et al.*, 2017). Un estudio realizado por Toombs *et al.* en Nueva Zelanda, evaluó el intercambio de aislados de *Escherichia coli* productores de BLEE entre animales de compañía y humanos con sospecha de ITU, evaluando la presencia de la misma cepa de *E. coli* productora de BLEE en el humano y la mascota del hogar. Este estudio demostró que un 35% de los hogares analizados tenían mascotas que poseían una cepa de *Enterobacteriaceae* con un fenotipo productor de BLEE, y en dos hogares se encontró la misma cepa de *E. coli* productora de BLEE tanto en la mascota como en la persona con sospecha de ITU (Toombs *et al.*, 2020).

Anteriormente *Klebsiella* spp. era la bacteria más frecuentemente asociada a BLEE, sin embargo, en los últimos años *Escherichia coli* está logrando mayor alcance en relación con este mecanismo de resistencia (Torres y Zarazaga, 2007). Esta premisa lo confirma Werhahn *et al.* (2023) quién realizó un estudio en una clínica veterinaria del norte de Alemania, con 1000 muestras (hisopados rectales) provenientes de 434 perros sin patología digestiva que fueron para controles preventivos o vacunas y 566 perros con diversas enfermedades como oftálmicas, ortopédicas, dentales, dérmicas y gastroenterológicas. Encontrando un 12% (52/434) de *E. coli* productoras de BLEE en mascotas que no acudieron con alguna patología sistémica ni digestiva

Actualmente, se ha incrementado la cantidad de cepas portadoras de enzimas betalactamasas de espectro extendido (BLEE), encontrándose con más frecuencia la del tipo CTX-M (Torres y Zarazaga, 2007). Ventura *et al.* (2024) realizaron un estudio donde se evaluó perros sin patología digestiva ni sistémica y sin antibioticoterapia en los últimos 12 meses, encontrando *E. coli* productora de BLEE de tipo CTX-M en 17% (9/53) de los perros. Cabe mencionar que de las 9 cepas de *E. coli* portadores del gen *bla*_{CTX-M}, solo tres expresaron fenotípicamente BLEE mediante la prueba de sinergia de doble disco (Rocha *et al.*, 2023).

En un estudio realizado en Europa donde se analizaron muestras provenientes de perros y gatos enfermos, se encontraron diez aislados bacterianos productores de BLEE, ocho eran *E. coli* y dos se identificaron como *K. pneumoniae*. De las diez cepas aisladas, nueve presentaban el gen *bla*_{CTX-M} y una cepa presentaba el gen *bla*_{TEM} (Bogaerts *et al.*, 2015). De manera similar, en un estudio realizado en el Hospital Veterinario de la Universidad Nacional de Taiwán con cepas bacterianas de *Klebsiella pneumoniae* proveniente de perros y gatos con ITU, se identificaron 19 aislados que expresaron genes *bla* (Lee *et al.*, 2024).

En Colombia se analizaron muestras de orina de perros provenientes de un Laboratorio Clínico Veterinario encontrando un 6.6% y un 44% de positividad para BLEE en las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* aisladas respectivamente (Ochoa *et al.*, 2021).

En Kolkata, India, se analizaron 70 cepas de *E. coli* provenientes de muestras fecales de caninos que cursaban con diarrea. Obteniéndose un 30% (21/70) de *E. coli* productoras de BLEE. Los principales genes de resistencia encontrados fueron: *bla*_{CTX-M} (100%), *bla*_{TEM} (28.57%) y *bla*_{SHV} (9.5%) (Tudu *et al.*, 2022).

En Cabo Verde, se analizaron 100 muestras de hisopados rectales provenientes de 50 perros confinados y de 50 perros no confinados, encontrándose 48 aislados de enterobacterias productoras de BLEE. De estas enterobacterias se encontró un 60.42% (29/48) de *Escherichia coli* y un 8.33% (4/48) de *Klebsiella pneumoniae* (Matos *et al.*, 2023).

Respecto al Perú, En el departamento de Lambayeque se realizó un estudio a las mascotas provenientes de la clínica veterinaria “La Viña”, observándose que el 65,4% (17/26) de las muestras estudiadas fueron positivas para enterobacterias productoras de BLEE, encontrando además un predominio de mascotas con exposición a antibióticos (65,4%) (Aguilar *et al.*, 2016).

En el departamento de Lima se realizó un estudio con muestras provenientes de perros sanos de la Clínica Veterinaria Docente Cayetano Heredia, obteniendo un 44.83% de enterobacterias productoras de BLEE, con un 44.83% correspondiente a *E. coli* y un 6.89% a *Klebsiella* spp. (Mendoza, 2020).

Otro estudio realizado en Lima en el año 2023 por Ventura *et al.*, analizó muestras de perros clínicamente sanos que asistieron a las veterinarias por motivo de vacunación o baños, estas nmuestras eran procedentes dos veterinarias de características socioeconómicas diferentes, una veterinaria de Surco y una de Villa El Salvador. Fueron detectados doce (13%) *E. coli* productores de BLEE (Ventura *et al.*, 2024)

El impacto de estas investigaciones afecta no solo a los animales de compañía, sino también a los humanos. Si bien ha ido aumentando en los últimos años las investigaciones sobre *E. coli* y *Klebsiella* spp. productoras de BLEE alrededor del mundo es aún escasa la información disponible en nuestro país, por lo que se requiere realizar más investigaciones en el Perú.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN Y TIEMPO

Este estudio se llevó a cabo durante los meses de junio del 2023 a diciembre del 2023, en el laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Sección Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM), en el distrito de San Borja, departamento Lima- Perú.

3.2. DESCRIPCIÓN DEL MATERIAL EXPERIMENTAL

3.2.1. MUESTRAS BIOLÓGICAS

Se evaluaron 14 aislados de *Klebsiella* spp. y 27 aislados de *Escherichia coli* previamente identificadas y criopreservadas, pertenecientes al cepario del Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Sección Bacteriología y Micología de la FMV-UNMSM. Estas muestras fueron obtenidas mediante hisopados rectales de perros que fueron atendidos en consulta médica en la Clínica de Animales Menores (CAME) de la FMV-UNMSM por diversos motivos como vacunación, controles rutinarios, seguimiento de tratamientos, entre otros, estas muestras fueron remitidas durante el año 2021. La información de las muestras se incluyó en el Anexo 1.

3.2.2. MATERIALES

- Control positivo *bla_{TEM}*: Cepa *Escherichia coli* EC225K (Alvarez *et al.*, 2022)
- Control positivo *bla_{SHV}*: Cepa *Klebsiella* spp. E213 (Datos no publicados)
- Control positivo *bla_{CTX-M}*: Cepa *Escherichia coli* EC247K (Alvarez *et al.*, 2022)
- Discos de ceftazidima 30µg (CAZ) Oxoid
- Discos de cefotaxima 30µg (CTX) (Oxoid)
- Discos de ceftazidima 30µg + ácido clavulánico 10µg (CAZ-CLA) (Oxoid)
- Discos de cefotaxima 30µg + ácido clavulánico 10µg (CTX-CLA) (Oxoid)
- Agar Mac Conkey
- Guantes de látex
- Guantes de nitrilo
- Cofias

- Mascarillas KN-95 y de 3 pliegues
- Mechero
- Ansas circulares y en punta
- Viales
- Gradillas
- Micropipetas de 10, 20, 100 y 1000 μ l (Eppendorf)
- Parafilm
- Agua destilada
- PCR-Cooler (Eppendorf)
- PCR-Rack (Eppendorf)
- Tips para micropipetas (Eppendorf)
- Alcohol de 70°
- Tubo para escala McFarland 0.5

3.2.3. EQUIPOS

- Flujo laminar (BIOSAN)
- PCR electrophoresis system (Cleaver Scientific)
- Vortex (Isolab)
- Bloque de calor (Thermo Scientific)
- Transiluminador SafeVIEW (Clevaer Scientific)
- Microcentrífuga (Thermo Scientific)
- Estufa
- Espectrofotómetro (DeNovix)
- Termociclador Biometra TOne (Analytik Jena)
- Refrigeradora
- Congeladora

3.2.4. REACTIVOS

- Buffer TBE (Cleaver Scientific)
- Agarosa SIGMA
- Lisozima (50mg/ml) (Thermo Scientific)
- Kit de extracción de ADN (GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit)
- Marcador de peso molecular 100bp (Opti-DNA Marker)
- Buffer de carga safe-green (ABM)
- EDTA 50 Mm
- Agar Tripticasa de Soya -TSA (Merck)

- Caldo Tripticasa de Soya -TSB (Merck)
- Agar Muller- Hinton (Merck)
- Glicerol 50%
- Cebador del gen *bla_{TEM}*
- Cebador del gen *bla_{CTX-M}*
- Cebador del gen *bla_{SHV}*

3.3. DESCRIPCIÓN DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

3.3.1. REACTIVACIÓN DE CEPAS

Se realizó la inoculación de 100 µL de las cepas criopersevadas de *Klebsiella* spp. y *Escherichia coli* en tubos con 1 ml de caldo TSB, luego fueron llevadas a la estufa para su posterior incubación durante 24 horas a 37°C, posteriormente se extrajo 0.1 ml y fueron sembradas por agotamiento en agar Tripticasa de Soya (TSA) y agar Mac Conkey (MC) y estuvieron en incubación durante 24 horas a 37°C

3.3.2. DETECCIÓN FENOTÍPICA CONFIRMATORIA DE BLEE

La detección fenotípica de BLEE se realizó mediante el método de discos combinados según lo que indica la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Las suspensiones bacterianas fueron preparadas en solución salina con un grado de turbidez de 0.5 según la escala McFarland y luego fueron inoculadas en placas de agar Mueller Hinton. Posteriormente, se colocaron discos que contenían 30 µg de cefotaxima (CTX), 30 µg de ceftazidima (CAZ) y discos que contenían dichos fármacos más 10 µg de clavulanato en el agar, y se dejaron en incubación durante 24 horas a 37°C antes de su posterior interpretación (Seral *et al.*, 2010).

Se consideraron positivos para BLEE, los aislados cuya medida de la zona de inhibición alrededor de uno de los discos combinados luego de la incubación fueron ≥ 5 mm que la zona de inhibición alrededor del disco de cefalosporina correspondiente, según lo recomendado por la CLSI y el fabricante (Carter *et al.*, 2000)

3.3.3. DETECCIÓN GENOTÍPICA DE BLEE

3.3.3.1. EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción del ADN de los aislados se realizó mediante el kit de extracción de ADN (GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit - Thermo Scientific ® Lituania) siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar, se tomó una colonia aislada de la cepa de *Klebsiella* spp. o *E. coli* en agar Mac Conkey y se inocularon en viales que poseían 1.5 ml de caldo Luria-Bertani (LB) para su posterior incubación durante 24 horas a 37 °C. Posteriormente fue centrifugado a 5000 g por 10 min y se descartó el sobrenadante. El precipitado fue resuspendido en 180 µL Buffer de Lisis según lo recomendado en el kit, luego se siguieron los pasos descritos

por el fabricante (Anexo 2). Después de haber extraído el ADN, se procedió a cuantificar algunos viales de manera aleatoria mediante espectrofotometría. Finalmente, los ADN extraído fueron preservados a -20 °C para su posterior uso.

3.3.3.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La detección genotípica se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para identificar la presencia de genes *bla*. Para identificar estos genes, se usaron cebadores específicos para los genes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* y *bla_{CTX-M}* (ver Cuadro 2). Para poder realizar este procedimiento se usaron 3 controles positivos, que fueron cepas portadoras de los genes en estudio, y controles negativos, que fueron cepas que no eran portadoras de los genes en estudio.

Cuadro 2. Cebadores utilizados para el gen *bla*

	Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño	Referencia
			(pb)	
<i>bla_{TEM}</i>	Forward	ATGAGTATTCAACATTTCCG	859	Archambault <i>et al.</i> , 2006.
	Reverse	ACCAATGCTTAATCAGTGAG		
<i>bla_{SHV}</i>	Forward	TTATCTCCCTGTTAGCCACC	854	Weill <i>et al.</i> , 2004; Jena <i>et al.</i> , 2017.
	Reverse	GATTTGCTGATTTGCTCGG		
<i>bla_{CTX-M}</i>	Forward	CGATGTGCAGTACCAGTAA	585	Batchelor <i>et al.</i> , 2005; Sahoo <i>et al.</i> , 2019
	Reverse	TTAGTGACCAGAATCAGCGG		

Fuente: (Batchelor *et al.*, 2005; Archambault *et al.*, 2006; Sahoo *et al.*, 2019).

3.3.3.2.1. PCR PARA EL GEN *bla_{TEM}*

Se utilizó como control positivo la cepa EC225K (*Escherichia coli*) del cepario, que expresó el gen *bla_{TEM}* en su secuenciamiento genético (Álvarez *et al.*, 2022), como control negativo se usó la cepa se usó la cepa ATCC25922 (*Escherichia coli*) y como control blanco se utilizó agua ultra pura. Se tomó el protocolo realizado Archambault *et al.* (2006) como referencia. Para la preparación de la solución para el PCR se manejó un volumen total de 20 µL, que contenían 1 µL de ADN (muestra) y 19 µL de Master Mix que contenía 0.4 µL de dNTP's, 0.2 µL de DreamTaq DNA Polymerase, 2 µL de DreamTaq Buffer + MgCl₂, 0.4 µL de cada cebador y 16 µL de H₂O ultra pura (Cuadro 3).

Cuadro 3. Concentraciones y volumen de la mezcla final de 20 µL para el gen *bla_{TEM}*

	Buffer	MgCl ₂	dNTPs	Cebador	Taq polimerasa	ADN	H ₂ O UP
<i>bla_{TEM}</i>	concentración final	1X	2 mM	0.2 mM	0.5 µm	1 U	20-50 ng/ µL
	volumen	2µL	0.4 µl	0.4 µL	0.2 µL	1 µl	16 µL

El termociclado se realizó bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de 7 min a 94 °C como desnaturalización inicial, seguido de 30 ciclos de 94 °C de desnaturalización por 1 minuto, 50°C de hibridación por 1 minuto y 72°C de elongación por 1 minuto, teniendo una elongación final de 10 minutos a 72 °C (Archambault *et al.* 2006).

3.3.3.2.2. PCR PARA EL GEN *bla_{SHV}*

Se utilizó como control positivo la cepa E213 del cepario que expresó el gen *bla_{SHV}* en su secuenciamiento genético (Datos no publicados), esta cepa fue aislada de un canino mediante hisopado rectal; como control negativo se usó la cepa ATCC25922 (*Escherichia coli*) y como control blanco se utilizó agua ultra pura. Se tomó el protocolo realizado por Jena *et al.* (2017) como referencia. Para la preparación de la solución para el PCR se manejó un volumen total de 20 µL, conteniendo 1 µL de ADN (muestra) y 19 µL de Master Mix que contenía 0.4 µl de dNTP's , 0.2 µL de DreamTaq DNA Polymerase (1 U), 2 µL Buffer + MgCl₂, 0.2 µL de cada cebador y 16.2 µL de H₂O ultra pura (Cuadro 4).

Cuadro 4. Concentraciones y volumen de la mezcla final de 20 µL para el gen *bla_{SHV}*

	Buffer	MgCl ₂	dNTPs	Cebador	Taq polimerasa	ADN	H ₂ O UP
<i>bla_{SHV}</i>	concentración final	1X	2 mM	0.2 mM	0.5 µm	1 U	20-50 ng/ µL
	volumen	2µL	0.4 µl	0.2 µL	0.2 µL	1 µl	16.2 µL

El termociclado se realizó bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de 5 min a 95 °C como desnaturalización inicial, seguido de 1 minuto de desnaturalización a 94 °C, 1 min de hibridación a 55°C de hibridación y 1 minuto de elongación a 72°C (30 ciclos), y una elongación final de 10 minutos a 72 °C (Jena *et al.* 2017).

3.3.3.2.3. PCR PARA EL GEN *bla_{CTX-M}*

Se utilizó como control positivo la cepa EC247K (*Escherichia coli*) del cepario, que expresó el gen *bla_{CTX-M}* en su secuenciamiento genético (Álvarez *et al.*, 2022), como control negativo se usó la cepa se usó la cepa ATCC25922 (*Escherichia coli*) y como control blanco se utilizó agua ultra pura. Se tomó el protocolo realizado por Sahoo *et al.* (2019) como referencia. Para la preparación de la solución para el PCR se manejó un volumen total de 20 µL, conteniendo 1 µL de ADN (muestra) y 19 µL de Master Mix que contenían 0.4 µl de dNTP's (0.2 mM), 0.2 µL de DreamTaq DNA Polymerase (1 U), 4 µL de Buffer, 1.2 µL de MgCl₂, 0.4 µL de cada cebador y 12.8 µL de H₂O ultra pura (Cuadro 5).

Cuadro 5. Concentraciones y volumen de la mezcla final de 20 µL para el gen *bla_{CTX-M}*

		Buffer	MgCl ₂	dNTPs	Cebador	Taq polimerasa	ADN	H ₂ O UP
<i>bla_{CTX-M}</i>	concentración final	1X	1.25mM	0.2 mM	0.5 µm	1 U	20-50 ng/ µL	12.8 µL
	volumen	4µL	1.2µL	0.4 µl	0.4 µL	0.2 µL	1 µl	

El termociclado se realizó bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de 5 min a 94 °C como desnaturalización inicial, seguido de 30 segundos de desnaturalización a 94 °C, 30 segundos de hibridación a 52°C y 1 minuto de elongación a 72°C (30 ciclos), y una elongación final de 7 minutos a 72 °C (Sahoo *et al.* 2019).

3.3.4. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Para realizar la electroforesis, se usó gel de agarosa al 1.5% previamente preparado. Se colocó el gel dentro de la cámara de electroforesis y se procedió a añadir TBE al 0.5X. Se tomó 5 µL del producto del termociclado de cada muestra y se mezcló con 1 µL del buffer de carga Safe Green y fueron colocados en su pocillo respectivo en el gel, finalmente se colocó un gel marcador de peso molecular 100bp Opti DNA Marker. La electroforesis fue corrida durante 90 minutos a 90 voltios. Para analizar los productos se usó un transiluminador de luz azul SafeVIEW.

La interpretación de la electroforesis se realizó mediante la ubicación de las bandas según su peso, considerando positivos a aquellas muestras cuyo peso del producto amplificado fue de 859 pb para *bla_{TEM}*, 854 pb para *bla_{SHV}* y 585 pb para *bla_{CTX-M}*.

IV. RESULTADOS

4.1 IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO:

Se obtuvieron 14 aislados de *Klebsiella* spp. y 27 aislados de *Escherichia coli*. De las 41 cepas analizadas, 5 cepas de *Klebsiella* spp. y 5 cepas de *Escherichia coli* resultaron sospechosas para la presencia de betalactamasas de espectro extendido. Posteriormente, mediante la prueba de discos combinados se confirmó la presencia de BLEE en un 22 % (9/41), de las cuales un 10% (4/41) fueron *Klebsiella* spp. y un 12% (5/41) fueron *Escherichia coli* (Cuadro 6). Por otro lado, 32 muestras resultaron negativas para la presencia de betalactamasas de espectro extendido. Los resultados fenotípicos de todas las cepas se detallan en el Anexo 3.

Cuadro 6. Frecuencia de BLEE según el método de discos combinados.

	(%)	# cepas			
		<i>Klebsiella</i> spp.	(%)	<i>Escherichia coli</i>	(%)
Positivo	22.0%	4	10%	5	12%
Negativo	78.0%	10	24%	22	54%
Total	100%	14		27	

4.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES DE RESISTENCIA *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M} MEDIANTE PCR:

Se realizó la detección de los genes de resistencia *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M} mediante la prueba de PCR al total (n=41) de las muestras siguiendo los protocolos ya mencionados en el capítulo anterior. Los productos obtenidos del PCR se analizaron mediante su visualización mediante la electroforesis en gel de agarosa.

En el Cuadro 7 se muestran los resultados obtenidos para la presencia de los 3 genes de resistencia *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M} en los aislados de *Klebsiella* spp. y *Escherichia coli* mediante PCR. Encontrándose la presencia del gen *bla*_{CTX-M} en un 41% (17/41), del gen *bla*_{TEM} en un 29% (12/41) y del gen *bla*_{SHV} en un 24% (10/41). Mientras que 13 de las muestras analizadas no presentaron ninguno de los tres genes *bla* analizados

Cuadro 7. Frecuencia de gen *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M} mediante PCR.

gen <i>bla</i>	POSITIVOS		% NEGATIVOS	
	(n)	(%)	(n)	(%)
<i>bla</i> _{TEM}	12	29%	29	71%
<i>bla</i> _{SHV}	10	24%	31	76%
<i>bla</i> _{CTX-M}	17	41%	24	59%

Los perfiles genotípicos de resistencia mostraron 5 tipos de combinaciones de los tres genes en estudio (Cuadro 8). Encontrando una cepa de *Klebsiella* spp. que presentó los tres genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M}, sin embargo esta cepa provenía de un paciente que acudió a consulta por un control, más no por una patología digestiva ni sistémica (ver Anexo 3). Además, el 46% (13/28) de nuestras muestras que fueron positivas para al menos un gen *bla* no presentaban ninguna patología digestiva; sin embargo, no se pudo acceder a la historia clínica del 54% (15/28) de muestras portadoras de los genes.

Cuadro 8. Combinaciones de genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M} en cepas analizadas.

GENES COMBINADOS	CANTIDAD	%
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{SHV} + <i>bla</i> _{CTX-M}	1	2%
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{SHV}	1	2%
<i>bla</i> _{SHV} + <i>bla</i> _{CTX-M}	2	5%
<i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{TEM}	9	22%

Con respecto a las 14 cepas de *Klebsiella* spp. analizadas, 13 cepas amplificaron al menos un gen *bla*. Los resultados obtenidos para la presencia de los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M} se muestran en el cuadro 9. El gen *bla*_{TEM} se encontró en un 36% (5/14) de las muestras, el gen *bla*_{SHV} estuvo presente en un 57% (8/14) y el gen *bla*_{CTX-M} en un 43% (6/14), mientras que solo un aislado amplificó los tres genes juntos. Además, dos de las muestras de *Klebsiella* spp. no amplificaron

ninguno de los tres genes *bla* analizados. Cabe resaltar que 9 muestras fueron negativas fenotípicamente, pero amplificaron al menos un gen *bla*.

Cuadro 9. Frecuencia de los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M} en cepas de *Klebsiella* spp.

gen <i>bla</i>	POSITIVOS		NEGATIVOS	
	# cepas positivas	% cepas positivas	# cepas negativas	% cepas negativas
<i>bla</i> _{TEM}	5	36%	9	64%
<i>bla</i> _{SHV}	8	57%	6	43%
<i>bla</i> _{CTX-M}	6	43%	8	57%
Ningún gen			1	7%

Con respecto a las 27 cepas analizadas de *Escherichia coli*, 15 cepas amplificaron al menos un gen *bla*. Los resultados obtenidos para la presencia de los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M} en la se muestran en el cuadro 10. El gen *bla*_{TEM} se encontró en un 26% (7/27), el gen *bla*_{SHV} se encontró en un 7% (2/27) y el gen *bla*_{CTX-M} se encontró en un 41% (11/27), mientras que ningún aislado amplificó los tres genes juntos. Además, 12 muestras resultaron negativas para los tres genes *bla* analizados. Cabe resaltar que 10 cepas de *E. coli* fueron negativas fenotípicamente, pero amplificaron al menos un gen *bla*.

Cuadro 10. Frecuencia de los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M} en cepas de *Escherichia coli*.

gen <i>bla</i>	POSITIVOS		NEGATIVOS	
	# cepas positivas	% cepas positivas	# cepas negativas	% cepas negativas
<i>bla</i> _{TEM}	7	26%	20	74%
<i>bla</i> _{SHV}	2	7%	25	93%
<i>bla</i> _{CTX-M}	11	41%	16	59%
Ningún gen			12	44%

Los resultados ya descritos se obtuvieron mediante la visualización de las bandas de los productos del PCR mediante la electroforesis. Las muestras positivas para el gen *bla_{TEM}* marcaron un peso de 859 pb (Figura 7), las muestras positivas para el gen *bla_{SHV}* tuvieron un peso de 854 pb (Figura 8) y las muestras positivas para el gen *bla_{CTX-M}* tuvieron un peso de 585 pb (Figura 9).

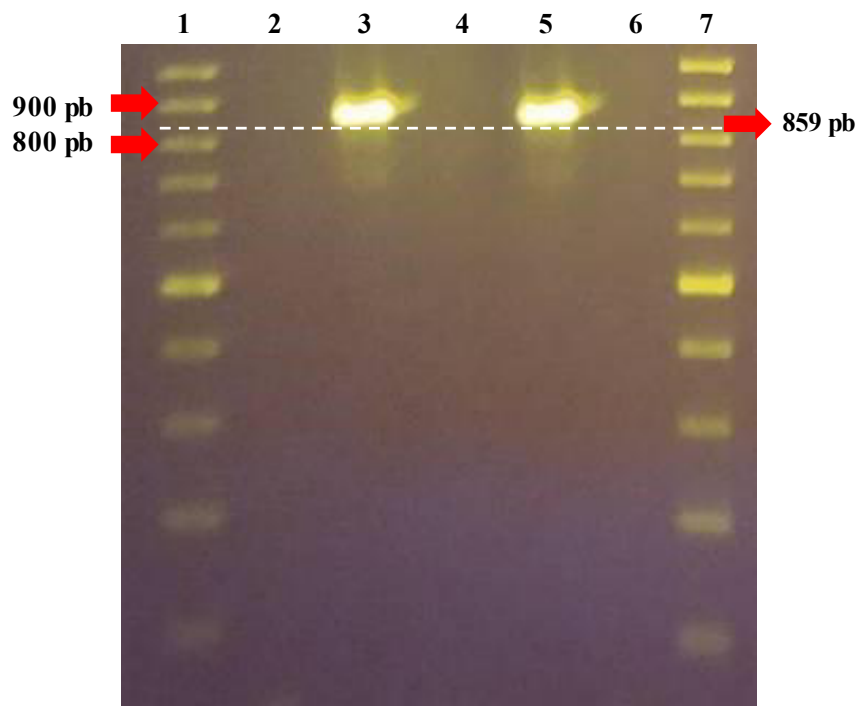


Figura 7. Electroforesis de productos amplificados para el gen *bla_{TEM}*. **Carril 1 y 7:** Marcador de peso molecular 100 pb; **Carril 2:** Control blanco; **Carril 3:** Control Positivo (EC225K); **Carril 4:** Control Negativo (ATCC 25922) **Carril 5:** Muestra Positiva al gen *bla_{TEM}* (E199); **Carril 6:** Muestra Negativa al gen *bla_{TEM}* (E217).

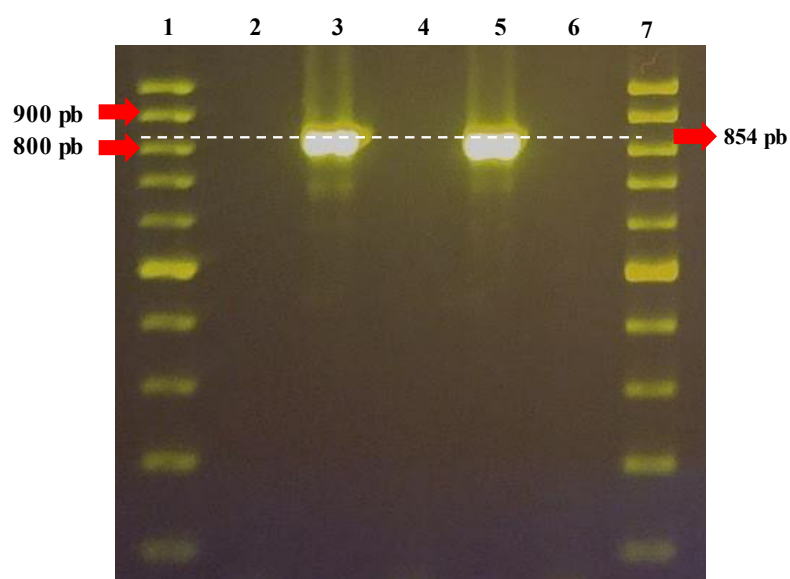


Figura 8. Electroforesis de productos amplificados para el gen *bla_{SHV}*. **Carril 1 y 7:** Marcador de peso molecular 100 pb; **Carril 2:** Control blanco; **Carril 3:** Control Positivo (E213); **Carril 4:** Control Negativo (ATCC 25922) **Carril 5:** Muestra Positiva al gen *bla_{SHV}* (E207); **Carril 6:** Muestra Negativa al gen *bla_{SHV}* (EC438).

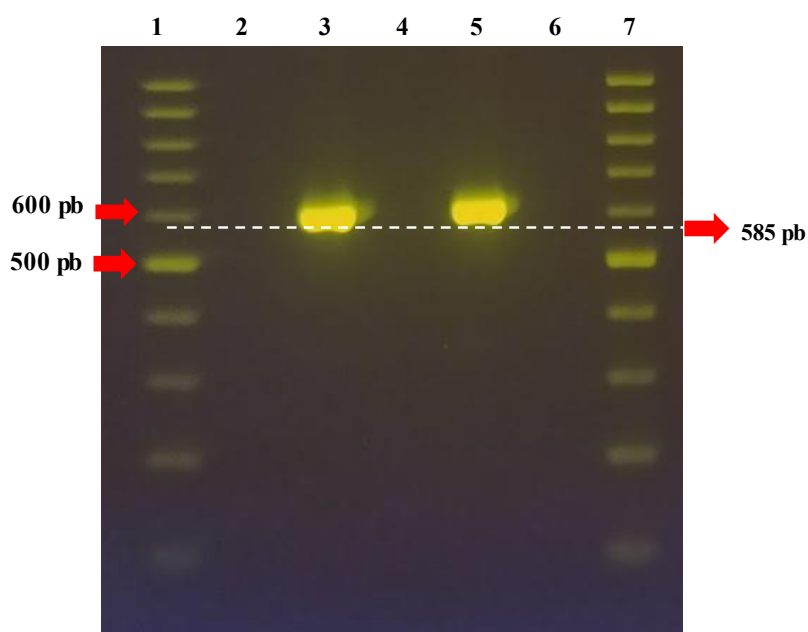


Figura 9. Electroforesis de productos amplificados para el gen *bla_{CTX-M}*. **Carril 1 y 7:** Marcador de peso molecular 100 pb; **Carril 2:** Control blanco; **Carril 3:** Control Positivo (EC247K); **Carril 4:** Control Negativo (ATCC 25922) **Carril 5:** Muestra Positiva al gen *bla_{CTX-M}* (EC445); **Carril 6:** Muestra Negativa al gen *bla_{CTX-M}*, (E219).

V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación se evidenció la presencia de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en muestras provenientes de hisopados rectales de perros que fueron atendidos en la Clínica de Animales Menores (CAME) de la FMV-UNMSM remitidas al Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Sección Bacteriología y Micología de la FMV-UNMSM durante el año 2021, el 34% (14/41) de las muestras fueron de pacientes que no padecían alguna patología digestiva, se desconoce la historia clínica del 66% (27/41) restante de las muestras. El fenotipo de resistencia de BLEE fue encontrado en un 22% (9/41) de las muestras analizadas, cuatro de estas muestras pertenecían a perros que no presentaban cuadros digestivos ni infecciosos y de las otras cinco muestras no se pudo acceder a su historia clínica por lo que no se pudo descartar ninguna patología. El porcentaje obtenido es menor a un estudio similar realizado en un distrito de Lima Norte dónde analizaron muestras de canes que no presentaban enfermedad digestiva ni sistémica, se detectó la presencia de BLEE mediante el método de sinergia de doble disco recomendado por la European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), encontrándose una prevalencia del 44.83% (27/58) de enterobacterias productoras de BLEE, identificándose que un 51.72% (30/58) del total de canes habían recibido antibioticoterapia en los seis meses previos al estudio, lo que pudo haber contribuido a que el porcentaje sea mayor al nuestro (Mendoza, 2020). De manera similar, el porcentaje es mucho menor de lo encontrado en el departamento de Chiclayo dónde analizaron muestras de pacientes de una Clínica Veterinaria de la localidad excluyendo a aquellos que tenían alguna enfermedad diarreica, la presencia de BLEE fue detectada mediante el método de discos combinados con inhibidor (método usado en el presente estudio) recomendado por la Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), obteniendo un 65.4% de enterobacterias productoras de BLEE; estas variaciones de prevalencia pudieron deberse a la diferencia sobre la tenencia de mascotas, las políticas de uso y de venta de antibióticos veterinarios en cada localidad (Aguilar *et al.*, 2016). Nuestros resultados demuestran que la presencia de BLEE en *E. coli* (12%) fue mayor

frente a la presencia de BLEE en *Klebsiella* spp. (10 %), estos datos concuerdan con el estudio realizado en perros sanos de la Clínica Veterinaria Docente Cayetano Heredia donde encontraron mayor prevalencia de BLEE en *E. coli* frente a *Klebsiella* spp. (Mendoza, 2020).

Los diferentes métodos fenotípicos para la detección de BLEE puede conllevar a limitaciones en su detección. El método de Jarlier recomendado por EUCAST ha demostrado ser muy sensible y práctico ya que la técnica es similar a la de un antibiograma de rutina; Sin embargo, depende de la destreza en la colocación de los discos y en la interpretación de la sinergia, algunas cepas con resistencia en paralelo a los inhibidores de betalactamasas pueden dificultar la detección de esta prueba. Por otra parte, pueden darse falsos positivos en cepas que presenten betalactamasas cromosómicas sensible a los inhibidores, cepas hiperproductoras de betalactamasa cromosómica K1 y cepas hiperproductoras de SHV-1. Por ello, la National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda como método de confirmación de BLEE el método de discos combinados mediante la comparación de los halos de inhibición de los discos de cefalosporinas (cefotaxima y/o ceftazidima) con los halos de inhibición de estos discos añadiendo ácido clavulánico (10 µg) (Calvo *et al.*, 2011)

Son escasos los estudios realizados en el Perú sobre la presencia de BLEE en perros; sin embargo, la prevalencia encontrada de enterobacterias productoras de BLEE son similares a los encontrados en otros países como Rumania (25.9%) y Kenia (18%) (Albrechtova *et al.*, 2012; Cozma *et al.*, 2015). Aunque, es mucho mayor de lo reportado en Brasil (8.3%) y México (5.7%) (Sallem *et al.*, 2013; Wedley *et al.*, 2011).

La producción de betalactamasas de espectro extendido como las de tipo TEM, CTX-M y SHV son las responsables de la producción de resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro. Los resultados del presente estudio muestran un predominio de genes de *bla*_{CTX-M} (41%) seguido de *bla*_{TEM} (29%) y *bla*_{SHV} (24%) en las cepas de *E. coli* y *Klebsiella* spp. analizadas.

El tipo de gen predominante en nuestro estudio fue el gen *bla*_{CTX-M}, similar a lo que pasa en humanos, la enzima BLEE tipo CTX-M se reporta como la más predominante en animales de compañía (Rubin *et al.*, 2014). El tipo de enzima CTX-M ha sido reportado en perros de Corea del Sur y en países europeos como Portugal y Túnez (Costa *et al.*, 2004; Sallem *et al.*, 2013). Se ha demostrado que BLEE tipo CTX-M es causante de importantes enfermedades en humanos de tipo nosocomial y adquiridas en la comunidad, encontrándose en aislados clínicos como en bacterias comensales de humanos y animales, y productos que forman parte de la cadena alimentaria lo que significa su amplia distribución sugiriendo su presencia como reservorio ambiental (Pallecchi *et al.*, 2007). Colquechagua *et al.* (2017) reporta la presencia de enterobacterias productoras de BLEE de tipo CTX-M en el Instituto Nacional de Salud del Niño

(Breña-Lima, Perú) provenientes de muestras de pacientes de origen hospitalario y de la comunidad, encontrándose una prevalencia de BLEE tipo CTX-M en *E. coli* de origen hospitalario de 94.4% y en *K. pneumoniae* de 87.2%, este hallazgo sugiere que los niños podrían estar más expuestos a la adquisición de cepas bacterianas resistentes debido al contacto físico más cercano que mantienen con sus mascotas y a la falta de correctas medidas de higiene. Una revisión realizada sobre la prevalencia global de BLEE durante los años 1990-2022, confirma la presencia de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE en el medio ambiente, animales y humanos, teniendo al gen *bla*_{CTX-M} como el gen más detectado reafirmando lo reportado en el presente estudio (Ramatla *et al.*, 2023). Estos resultados nos indica la diseminación global del gen *bla*_{CTX-M} tanto en animales como en humanos. En el norte de Kenia, se realizó un estudio enfocado en una zona rural habitada por tribus, en esta zona la medicina veterinaria para animales pequeños es ausente y la administración de antibióticos se realiza de manera ocasional para tratar al ganado por lo que la presión antibiótica selectiva se podría minimizar, el estudio analizó muestras provenientes de humanos, perros y gatos en busca de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido, obteniendo al gen *bla*_{CTX-M-15} en todas las muestras de *E. coli* positivas a BLEE. Estos hallazgos respaldan lo encontrado en nuestro estudio y reafirman la propagación global del gen *bla*_{CTX-M} incluso en zonas muy alejadas dónde es muy raro el uso de cefalosporinas de espectro extendido, lo que nos orienta a pensar en otros factores que facilitan la diseminación de la resistencia, tales como el clima, la falta de instalaciones sanitarias y la dependencia de los canes domésticos al consumo de las sobras de alimentos en los hogares (Albrechtova *et al.*, 2012).

Con respecto al gen *bla*_{TEM}, los valores encontrados son cercanos al de un estudio realizado en China dónde se analizaron muestras de *Escherichia coli* provenientes de perros y gatos encontrándose al gen *bla*_{TEM} como segundo gen mayormente aislado luego de *bla*_{CTX-M} (Sun *et al.*, 2010). Hay estudios que reportan porcentajes distintos al de presente estudio, cómo el de Loncaric *et al.* (2020) quienes mencionan al gen *bla*_{TEM} (70%) como gen predominante en su estudio, dónde analizan 36 cepas de enterobacterias, de las cuales un 77.8% (28/36) eran *E. coli*, y un 8.3% eran *Klebsiella pneumoniae*., provenientes de perros y gatos con infecciones urogenitales.

El gen *bla*_{SHV} fue el gen con menor prevalencia con un 24%; sin embargo, el 80% de estas muestras positivas pertenecían al género *Klebsiella* spp., datos similares a un estudio realizado en China dónde detectaron enterobacterias productoras de BLEE de muestras de perros de un hospital veterinario, encontrando un 66.7% de presencia del gen *bla*_{SHV}, de las cuales un 90.9% eran *Klebsiella pneumoniae* (An *et al.* 2024). *Klebsiella pneumoniae* es la especie de mayor importancia dentro del género *Klebsiella* spp. y está indicada como una de las causas principales de enfermedades nosocomiales en humanos (Podschun y Ullmann, 1998). En animales es descrita

como causante de infecciones en el aparato respiratorio, piometra, mastitis, cuadros de septicemia, entre otros. Las cepas de *Klebsiella* spp. analizadas en el presente estudio formaron parte de un trabajo de investigación realizado en paralelo, dónde reportaron que nueve de las catorce cepas de *Klebsiella* spp. pertenecieron al género *K. pneumoniae*. (Cruz, 2023).

Se observó diferencia en la detección fenotípica y genotípica de bacterias productoras de BLEE, teniendo a 9 cepas de *Klebsiella* spp. y 10 cepas de *Escherichia coli* que fueron negativas al fenotipo de BLEE; sin embargo, amplificaron al menos un gen en el PCR. Esta diferencia se justifica debido a la sensibilidad menor del método fenotípico y la intervención de factores ambientales en la resistencia (Yazdi *et al.*, 2012). Giriyaapur *et al.* (2011) demostraron que diferentes métodos fenotípicos llevaron a diferentes resultados para la detección de aislados positivos a BLEE. Por el contrario, el método genotípico que logra amplificar los genes de resistencia mediante PCR parece tener un 100 % de especificidad y sensibilidad. Por lo tanto, una mala identificación de la resistencia bacteriana puede conllevar a una incorrecta prescripción y administración de antibióticos en la terapéutica ocasionando así bacterias capaces de producir nuevos genes de resistencia mediante presión selectiva, por lo que se recomienda la detección molecular como método de elección para la correcta detección de enterobacterias productoras de BLEE (Yazdi *et al.*, 2012).

De las 9 muestras positivas fenotípicamente a BLEE, todas albergaban al menos un gen *bla*. De estas muestras, se puede afirmar que 4 muestras provenían de pacientes que acudieron a consultas por motivos como: controles rutinarios (2), presencia de hernia umbilical (1) y decaimiento (1). No se pudo corroborar si habían cursado con algún cuadro clínico en los últimos meses o si habían recibido antibioticoterapia previa, por lo que no podemos afirmar si estuvieron expuestas a tratamientos basados en cefalosporinas exacerbando así la presencia de estas enterobacterias productoras de BLEE. Una de estas muestras fue positiva a *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M}, proveniente de un can que acudió a consulta médica por controles rutinarios. De las 19 muestras negativas al fenotipo de BLEE que albergaban al menos un gen evaluado; podemos afirmar que nueve de estas muestras eran provenientes de canes que no presentaban patología digestiva ni sistémica.

La ausencia de patologías digestivas ni sistémicas indican a los perros muestreados en el presente estudio como portadores asintomáticos de estos genes de resistencia. La presencia de estos portadores sugiere que estos perros podrían cumplir un papel importante en la diseminación de bacterias resistentes hacia los humanos. La transmisión de las bacterias resistentes entre animales y humanos implica que las intervenciones antimicrobianas podrían afectar indirectamente al microbioma de otros individuos dentro del mismo hogar. Particularmente, el tracto gastrointestinal de los animales como los de compañía, pueden actuar como reservorio de bacterias resistentes que pueden causar infecciones en perros que se encuentren vulnerables y

puede representar una fuente de contaminación hacia los humanos. Los perros podrían transmitirnos esas bacterias debido al estrecho contacto que existe en la actualidad entre los propietarios y sus mascotas. (Mandujano *et al.*, 2024) Existen otros factores como el uso por parte de los médicos veterinarios de medicamentos antimicrobianos que están reservados para su uso en humanos en el tratamiento de enfermedades infecciosas, generando una presión de selección que promueve la diseminación intersectorial o intrasectorial, ya sea por diseminación clonal o por transferencia horizontal de estos genes hacia patógenos bacterianos (Yoon *et al.*, 2024). Este factor se agrava cuando los dueños de las mascotas no realizan el tratamiento de forma adecuada y no los culminan. Un factor de riesgo son los hábitos alimenticios de los animales de compañía ya que algunos los alimentan con carne cruda, residuos de alimentos y suplementos alimenticios; sin embargo, no contamos con el historial alimenticio de los canes del presente estudio, por lo que no podemos precisar el papel de la alimentación en la presencia de genes de resistencia. Otro factor importante de la adquisición de estas cepas resistentes es el estilo de vida que el dueño proporciona a la mascota. Por ejemplo, las mascotas que están solos dentro de casa o en el jardín la mayoría del tiempo o nunca salen a pasear, y las mascotas que puede estar en contacto con animales de granja o animales salvajes cerca de su entorno (Mandujano *et al.* 2024). Otro factor que favorece la transmisión de esta resistencia es el estrecho contacto entre animales de compañía a humanos que brinda un ambiente favorable mediante el contacto directo como caricias, lamidas, arañazos, o de manera indirecta mediante la contaminación de los alimentos y superficies del entorno doméstico. Se ha descrito el intercambio de *Escherichia coli* entre humanos sanos y perros que viven en el mismo hogar bajo estrecho contacto (Johnson *et al.*, 2008) Un estudio realizado el presente año, evaluó la transferencia de plásmidos entre *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* provenientes de muestras fecales de caninos, ambas bacterias eran productoras de betalactamasas de espectro extendido portadoras del gen *bla_{CTX-M}*. Se sometieron a diferentes condiciones de temperatura imitando la temperatura corporal en perros (39°C), la temperatura corporal humana (36°C) y la temperatura ambiental (28°C). Encontrándose en aislados de *E. coli*. una transferencia de plásmidos más eficiente en el nivel de temperatura más elevada que fue la temperatura corporal de caninos. La diseminación ocurrió principalmente por transferencia horizontal de genes en *E. coli* mientras que *Klebsiella* spp. fue por diseminación clonal (Yoon *et al.*, 2024).

La detección fenotípica de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido realizadas en el presente estudio, respaldada por la detección molecular de genes *bla* que codifican estas enzimas refuerzan la posibilidad de transmisión de estas bacterias resistentes entre animales de compañía y humanos a través de un contacto directo o indirecto, por lo que se hace necesario tomar medidas preventivas para evitar su propagación en el país.

Debido a su importancia clínica la OMS ha actualizado su lista de patógenos bacterianos prioritarios para el 2024, clasificando a las enterobacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación como *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. como patógenos de prioridad crítica representando una amenaza considerable para la salud humana (OMS, 2024). Evaluar la prevalencia de estas bacterias resistentes a los medicamentos en diferentes fuentes es fundamental para establecer pautas en la atención de la salud veterinaria y humana. La diseminación de *E. coli* y *Klebsiella* spp. productoras de betalactamasas de espectro extendido genera preocupación sobre la prevención de su transmisión, el manejo y la profilaxis de infecciones en medicina veterinaria. Nuestros resultados resaltan la importancia del enfoque “Una Sola Salud”, exigiendo la colaboración y trabajo conjunto entre disciplinas relacionadas a la sanidad humana, veterinaria y medio ambiente, logrando así una salud óptima en animales, seres humanos y el medio ambiente.

VI. CONCLUSIONES

- Se evidenció la presencia de *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. productoras de BLEE en aislados de perros en Lima-Perú.
- Se encontró una frecuencia fenotípica de enterobacterias productoras de BLEE en perros del 22 %, correspondiendo un 12 % a *Escherichia coli* y un 10 % a *Klebsiella* spp.
- Se detectaron genes *bla* en *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. productoras de BLEE, teniendo como el gen más frecuente al gen *bla_{CTX-M}* con 41%, seguido del gen *bla_{TEM}* con un 29% y el gen *bla_{SHV}* en un 24%.

VII. LITERATURA CITADA

1. **Aguilar F, Santamaría O, Vargas N, Silva H. 2016.** Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en muestras fecales de humanos y mascotas: Chiclayo, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica* 33(2): 375-377.
2. **Albrechtova K, Dolejska M, Cizek A, Tausova D, Klimes J, Bebor L. 2012.** Dogs of Nomadic pastoralists in northern Kenya are reservoirs of plasmid-mediated Cephalosporin- and Quinolone-Resistant *Escherichia coli*, including pandemic clone B2-O25-ST131. *Antimicrob Agents Chemother* 56 (7): 4013– 4017.
3. **Allocati N, Masulli M, Alexeyev M, Di C. 2013.** *Escherichia coli* in Europe: an overview. *Int J Environ Res Public Health* 10(12): 6235- 6254.
Doi: 10.3390/ijerph10126235
4. **Álvarez, Delfín. 2010.** Identificación de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias. *Revista Habanera de Ciencias Médicas* 9(4): 516-524.
5. **Alvarez L, Carhuaricra D, Palomino-Farfan J, Calle S, Maturrano L, Siuce J. 2022.** Draft Genome Sequences of 10 Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Strains Isolated from Piglets in Peru. *Microbiol Resour Announc*; 11(10).
Doi:10.1128/mra.00706-22
6. **Amate A. 2023.** Empleo de endolisinas frente a bacterias gran-negativas. Trabajo de fin de Grado: Bioquímica. España: Universidad de Navarra.
7. **Ambler RP. 1980.** La estructura de las β -lactamasas. *Filos. Trans. R. Soc. London*,27: 321–331.
8. **An L, Wu Y, Zhang B, Xu Q, Liao L, Wu S, Xu X, He Q, Pei X, Chen J. 2024.** Transmission chains and molecular characterizations of extended-spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae at a veterinary hospital in Chengdu, China. *Infect Genet Evol.* 105658.
9. **Baene I. 1998.** Resistencia Bacteriana. Principios fundamentales para la práctica quirúrgica. *Rev. Colombiana Cir*, 13.

10. **Batchelor M, Hopkins K, Threlfall EJ, Clifton-Hadley FA, Stallwood AD, Davies RH, Liebana E. 2005.** *bla*(CTX-M) genes in clinical Salmonella isolates recovered from humans in England and Wales from 1992 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother.*49(4):1319-22.

11. **Bisso. 2018.** Resistencia a antimicrobianos. *Rev Soc Peru Med Interna*;31(2):50-59.

12. **Bogaerts P, Huang T, Bouchahrouf W, Bauraing C, Berhin C, El Garch F. 2015.** Characterization of ESBL- and AmpC-producing Enterobacteriaceae from diseased companion animals in Europe. *Microb Drug Resist.*;216:643–50. doi:10.1089/mdr.2014.0284

13. **Bouckennooghe AR, Jiang ZD, De La Cabada FJ, Ericsson CD, DuPont HL. 2002.** Enterotoxigenic Escherichia coli as cause of diarrhea among Mexican adults and US travelers in Mexico. *J Travel Med.* 9(3):137-40.
Doi: 10.2310/7060.2002.23206.

14. **Bradford PA. 2001.** Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.*14(4):933-951.

15. **Bush K, Jacoby GA. 2010.** Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(3):969-976.
Doi: 10.1128/AAC.01009-09.

16. **Bush K. 2018.** Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* ;62(10). doi: 10.1128/AAC.01076-18.

17. **Calvo J, Cantón R, Fernández F, Mirelis B, Navarro F. 2011.** Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. *Procedimientos en Microbiología Clínica.* España: Madrid. 38: 42-43

18. **Camacho Silvas. 2023.** Resistencia bacteriana, una crisis actual [Bacterial resistance, a current crisis.]. *Rev Esp Salud Publica.*97:e202302013..

19. **Carroll K, Morse S, Mietzner T, Miller S. 2016.** *Microbiología Médica.* Jawetz, Melnick y Adelberg. 27º ed. México DF. Mcgraw-Hill/Interamericana editores.

20. **Carter M, Oakton K, Warner M, Livermore D. 2000.** Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases in *Klebsiellae* with the Oxoid Combination Disk Method Oxoid . J.Clin. Microbiol . 38 :4228–4232.
21. **Castanheira M, Simner P, Bradford P. 2021.** Extended-spectrum β -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. JAC Antimicrob Resist. 16;3(3).
doi: 10.1093/jacamr/dlab092.
22. **Clegg S, Murphy C. 2016.** Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. Microbiology Spectrum, 4(1).
23. **Clermont O, Gordon D, Brisse S, Walk S, Denamur E. 2011.** Characterization of the cryptic *Escherichia* lineages: Rapid identification and prevalence. Environ. Microbiol. 13(9): 2468–2477
24. **Colquechagua F, Sevilla C, Gonzales E. 2015.** Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en muestras fecales en el Instituto Nacional de Salud del Niño, Perú. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica, 32(1), 26-32.
25. **Costa D, Poeta P, Briñas L, Sáenz Y, Rodrigues J, Torres C. 2004.** Detection of CTX-M-1 and TEM-52 β -lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy pets in Portugal, Journal of Antimicrobial Chemotherapy.54(5): 960–961.
Doi:10.1093/jac/dkh444
26. **Cozma A, Carp–Cărare M, Ciocan O, Carp–Cărare C, Guguianu E, Rîmbu C, Mares M. 2015.** The prevalence of positive ESBL *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains in the dogs in the Iași Paddock. Lucr Șt Med Vet .48 (2): 74-80.
27. **Croxen M, Law R, Scholz R, Keeney K, Wlodarska M, Finlay B. 2013.** Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev.26:822–880.
28. **Cruz E. 2023.** Detección de genes de carbapenemasas en *Klebsiella* spp. procedentes de perros y gatos con cuadros clínicos. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos.75p.

29. **Daza R. 1998.** Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Inf Ter Sist Nac.* 22:57-67.
30. **Dong N, Yang X, Chan E, Zhang R, Chen S. 2022.** *Klebsiella* species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance. *EBioMedicine.*79:103998. doi: 10.1016/j.ebiom.2022.103998.
31. **Drancourt M, Bollet C, Carta A, Rousselier. 2001.** P. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.*51:925–32.
32. **Garcés X. 2019.** Determinación de la presencia de genes de resistencia a betalactámicos y evaluación de diversidad clonal en aislados de *Escherichia coli* de origen canino de la ciudad de Ambato. Tesis de Médico Veterinario y Zootecnista. Ecuador: Universidad Técnica de Ambato.
33. **García C, Pardos de la Gándara M, Castillo F. 2010.** Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 28 (1):12-18.
34. **García M, Díaz D, Huerta C, Olazábal J, Barrios M, Chipayo Y. 2019.** Análisis retrospectivo de agentes bacterianos y patrones de susceptibilidad antibiótica en casos de infecciones del tracto urinario en caninos domésticos (2012-2017). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú,* 30(4): 1837-1844.
35. **Giriyaapur R, Nandihal N, Krishna B, Patil A, Chandrasekhar M. 2011.** Comparison of disc diffusion methods for the detection of extended-spectrum Beta lactamase-producing enterobacteriaceae. *J Lab Physicians.* 2011 Jan;3(1):33-6.
Doi: 10.4103/0974-2727.78561.
36. **Ghafourian S, Sadeghifard N, Soheili S, Sekawi Z. 2015.** Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. *Curr Issues Mol Biol.* ;17:11-21.
37. **Gómez J, García E, Hernández A. 2015.** Los betalactámicos en la práctica clínica. *Rev Esp Quimioter* ;28(1): 1-9.

38. **Håkonsholm F, Hetland MA, Svanevik CS, Sundsfjord A, Lunestad BT, Marathe NP.** Antibiotic Sensitivity Screening of *Klebsiella* spp. and *Raoultella* spp. Isolated from Marine Bivalve Molluscs Reveal Presence of CTX-M-Producing *K. pneumoniae*. *Microorganisms*. 8(12):1909.
Doi: 10.3390/microorganisms8121909.
39. **Herridge WP, Shibu P, O'Shea J, Brook TC, Hoyles L. 2020.** Bacteriophages of *Klebsiella* spp., their diversity and potential therapeutic uses. *J Med Microbiol*.69(2):176-194.
Doi: 10.1099/jmm.0.001141.
40. **Holt K, Wertheim H, Zadoks R, Baker S, Whitehouse C, Dance D, Jenney A, Connor T, Hsu L, Severin J, Brisse S, Cao H, Wilksch J, Gorrie C, Schultz M, Edwards D, Nguyen K, Nguyen T, Dao T, Mensink M, Minh V, Nhu N, Schultz C, Kuntaman K, Newton P, Moore C, Strugnell R, Thomson N. 2015.** Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proc Natl Acad Sci U S A*.112(27):E3574-81.
Doi: 10.1073/pnas.1501049112.
41. **Hordijk J, Schoormans A, Kwakernaak M, Duim B, Broens E, Dierikx C, Mevius D, Wagenaar JA. 2013.** High prevalence of fecal carriage of extended spectrum β -lactamase/AmpC-producing *Enterobacteriaceae* in cats and dogs. *Front Microbiol*.4:242. doi: 10.3389/fmicb.2013.00242.
42. **Jacoby GA, Medeiros AA. 1991.** More extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 35(9):1697-704. doi: 10.1128/AAC.35.9.1697.
43. **Janke BH, Francis DH, Collins JE, Libal MC, Zeman DH, Johnson DD. 1989.** Attaching and effacing *Escherichia coli* infections in calves, pigs, lambs, and dogs. *J Vet Diagn Invest*. 1(1):6-11. doi: 10.1177/104063878900100104
44. **Jena J, Sahoo RK, Debata NK, Subudhi E. 2017.** Prevalence of TEM, SHV, and CTX-M genes of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections in adults. *3 Biotech*.;7(4):244. doi: 10.1007/s13205-017-0879-2
45. **Jerse AE, Yu J, Tall BD, Kaper JB. 1990.** A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA*.87:7839–7843

46. **Johnson JR, Owens K, Gajewski A, Clabots C. 2008.** *Escherichia coli* colonization patterns among human household members and pets, with attention to acute urinary tract infection. *J Infect Dis.* 197(2):218-24..
47. **Kaper J, Nataro J, Mobley H. 2004.** Patógena *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2. 123–140
<https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
48. **Kjaergaard AB, Carr AP, Gaunt MC. 2016.** Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) infection in association with acute gastroenteritis in 7 dogs from Saskatchewan. *Can Vet J.* 57(9):964-8.
49. **Klaper K, Hammerl JA, Rau J, Pfeifer Y, Werner G. 2021.** Genome-Based Analysis of *Klebsiella* spp. Isolates from Animals and Food Products in Germany, 2013-2017. *Pathogens.*10(5):573.
Doi: 10.3390/pathogens10050573.
50. **Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. 1985.** Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 28(2):302-7.
Doi: 10.1128/AAC.28.2.302
51. **Kon K, Rai M. 2016.** Antibiotic resistance: mechanisms and new antimicrobial approaches.El Siever Inc. 121p
52. **Leclerc H. 1962.** Biochemical study of pigmented Enterobacteriaceae. *Ann Inst Pasteur.*102:726-
53. **Lezameta L, Gonzáles Edgar, Tamariz J. 2010.** Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de beta-lactamasas de espectro extendido. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica,* 27(3), 345-351.
54. **Li S, Liu J, Zhou Y, Miao Z. 2017.** Characterization of ESBL-producing *Escherichia coli* recovered from companion dogs in Taiwan, China. *J Infect Dev Ctries* 11 (3): 282-286.
55. **Livermore DM, Yuan M. 1996.** Antibiotic resistance and production of extended-spectrum beta-lactamasas amongst *Klebsiella* spp. from intensive care units in Europe. *J Antimicrob Chemother.* ; 38(3):409-24.

56. **Loncaric I, Misic D, Szostak MP, Künzel F, Schäfer-Somi S, Spargser J. 2020.** Broad-Spectrum Cephalosporin-Resistant and/or Fluoroquinolone-Resistant Enterobacterales Associated with Canine and Feline Urogenital Infections. *Antibiotics (Basel)* ;9(7):387.
Doi: 10.3390/antibiotics9070387

57. **Mandujano JA, Vázquez J, De Luna EJ, Rivera G, Bocanegra V, Martínez AV. 2024.** Antibiotic resistant *Escherichia coli* strains in healthy pets from Tamaulipas, Mexico. *Acta Microbiol Immunol Hung.*71(3):228-236.

58. **Martín G. 2002.** Resistencia Bacteriana a β -lactámicos: Evolución y Mecanismos. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 21(1), 107-116.

59. **Matos A, Cunha E, Baptista L, Tavares L, Oliveira M. 2023.** ESBL-Positive Enterobacteriaceae from Dogs of Santiago and Boa Vista Islands, Cape Verde: A Public Health Concern. *Antibiotics (Basel)*. 12(3):447.
Doi: 10.3390/antibiotics12030447.

60. **McEwen SA, Collignon PJ. 2018.** Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiol Spectr.* 6(2).
Doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017.

61. **Mendoza V. 2020.** Frecuencia de *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. y *Enterobacter* spp. productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en perros clínicamente sanos. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia.

62. **Nagy B, Fekete P. 2005.** Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol.* 295(6-7):443-54.
Doi: 10.1016/j.ijmm.2005.07.003

63. **Nataro JP, Kaper JB. 1998.** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* ;11(1):142-201.

64. **Jenkins C, Rentenaar R, Landraud L, Brisse S. 2017.** Enterobacteriaceae. *El Siever. In Infectious Diseases*; 2: 1565-1578.

65. **Lawlor MS, Hsu J, Rick PD, Miller VL. 2005.** Identification of *Klebsiella pneumoniae* virulence determinants using an intranasal infection model. *Mol Microbiol*; 58(4):1054-73.

66. **Lee MMY, Kuan NL, Li ZY, Yeh KS. 2024.** Occurrence and characteristics of extended-spectrum- β -lactamase- and pAmpC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from companion animals with urinary tract infections. PLoS One; 19(1): e0296709
67. **Li XZ, Mehrotra M, Ghimire S, Adewoye. 2007.** L. β -Lactam resistance and β -lactamases in bacteria of animal origin. Vet Microbiol; 121:197-214
68. **Lopardo H, Predari S, Vay C. 2016.** Manual de microbiología clínica de la Asociación Argentina de Microbiología: Enterobacterias 1° ed. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología. 105-125.
69. **Medeiros A. 1997.** Beta-Lactamases: quality and resistance. Clin Microbiol Infect.3 Suppl 4:2-9
70. **Mendoza V. 2020.** Frecuencia de *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. y *Enterobacter* spp. productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en perros clínicamente sanos. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia.
71. **Morales S, Yepes J, Prada J, Torres A. 2019.** Enterobacteria in the 21st century: a review focused on taxonomic changes. J Infect Dev Ctries. 13(4):265-273.
72. **Nakazato G, Gyles C, Ziebell K, Keller R, Trabulsi L, Gomes T, Pestana De Castro A. 2004.** Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *E. coli* (EPEC). Veterinary Microbiology, 101(4), 269–277. doi:10.1016/j.vetmic.2004.04.009
73. **OMS. 2016.** Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. Ginebra: Organización Mundial de la salud. .[Internet] [14 enero 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/es>
74. **OMS. 2024.** La OMS pone al día la lista de bacterias farmacorresistentes más peligrosas para la salud humana. Ginebra: Organización Mundial de la salud. [Internet] [20 mayo 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>
75. **OMS.2017.** La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. [Internet] [20 marzo 2024]. Disponible en:

<https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

76. **Ochoa A, Garcia M, Cienfuegos A, Vasquez L. 2022.** Aislamiento de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido a partir de orina de perros del Área metropolitana del Valle de Aburrá (Antioquia, Colombia). *Rev. Med. Vet. Zoot.* 69(3): 245-258.
77. **Pallecchi L, Bartoloni A, Fiorelli C, Mantella A, Di Maggio T, Gamboa H, Gotuzzo E, Kronvall G, Paradisi F, Rossolini GM. 2007.** Rapid dissemination and diversity of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase genes in commensal *Escherichia coli* isolates from healthy children from low-resource settings in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother*;51(8): 2720-5.
78. **Parija S. 2012.** Textbook of Microbiology and Immunology. 2nd edition. El Siever.
79. **Paterson D, Bonomo R. 2005.** β -lactamasas de espectro extendido : una actualización clínica. *Clin Microbiol Rev.* 18: 657– 686
80. **Pérez P, Galán F, Gutiérrez D, Guerrero I. 2014.** Infecciones por enterobacterias. *Medicine* 11 (55): 3276-3282
81. **Perez F, Endimiani A, Hujer KM, Bonomo RA. 2007.** The continuing challenge of ESBLs. *Curr Opin Pharmacol.* 7(5):459-69.
82. **Pintarić S, Štritof Z, Perko VM, Tumpa A, Cvetnić M, Hadžić L. 2023.** Detection of *bla*_{CTX-M} genes in ESBL-producing *Klebsiella* isolates from animals in Croatia. *Acta Vet Hung.*71(1):12-15.
83. **Podschun R, Ullmann U.1998.** *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev.* 11(4):589-603.
84. **Pomba C, Rantala M, Greko C, Baptiste KE, Catry B, van Duijkeren E, Mateus A, Moreno MA, Pyörälä S, Ružauskas M, Sanders P, Teale C, Threlfall EJ, Kunsagi Z, Torren-Edo J, Jukes H, Törneke K. 2017.** Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. *J Antimicrob Chemother* 72:957–968. doi: 10.1093/jac/dkw481.

85. **Puerta A, Mateos F. 2010.** Enterobacterias. *Medicine Prog Form Méd Cont Acred* 10(51): 3426-3431.

86. **Ramatla T, Mafokwane T, Lekota K, Monyama M, Khasapane G, Serage N, Nkhebenyane J, Bezuidenhout C, Thekiso O. 2023.** "One Health" perspective on prevalence of co-existing extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* .22(1):88.

87. **Rawat D, Nair D. 2010.** Extended-spectrum β -lactamases in Gram Negative Bacteria. *J Glob Infect Dis.* 2(3):263-74.

88. **Riwu KHP, Effendi MH, Rantam FA, Khairullah AR, Widodo A. 2022.** A review: Virulence factors of *Klebsiella pneumoniae* as emerging infection on the food chain. *Vet World.* 2022 Sep;15(9):2172-2179.

89. **Rocha RC, Cortés G, Lozano P, Bello F, Martínez Y, Torres C. 2015.** Faecal *Escherichia coli* isolates from healthy dogs harbour CTX-M-15 and CMY-2 β -lactamases. *Vet J.* 2015 Mar;203(3):315-9.

90. **Rodríguez-Medina N, Barrios-Camacho H, Duran-Bedolla J, Garza-Ramos U. 2019.** *Klebsiella variicola*: an emerging pathogen in humans. *Emerg Microbes Infect* ;8(1):973-988.

91. **Rubin J, Pitout, J. 2014.** Extended-spectrum β -lactamase, carbapenemase and AmpC producing Enterobacteriaceae in companion animals. *Veterinary Microbiology*; 170(1-2): 10–18. Doi:10.1016/j.vetmic.2014.01.017

92. **Ryan C, Kenneth J, Ray G. 2017.** Sherris Microbiología Médica. Ed McGraw-Hill Interamericana. 6ta Ed. México.

93. **Sallem RB, Gharsa H, Slama KB, Rojo-Bezares B, Estepa V, Porres-Osante N, Jouini A, Klibi N, Sáenz Y, Boudabous A, Torres C. 2013.** First detection of CTX-M-1, CMY-2, and QnrB19 resistance mechanisms in fecal *Escherichia coli* isolates from healthy pets in Tunisia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 13(2):98-102.

94. **Samanta I, Bandyopadhyay S. 2020.** *Klebsiella*. Antimicrobial Resistance in Agriculture, 153–169.
95. **Seral C, Pardos M, Castillo J. 2010.** Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*, Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 28(1): 12-18.
96. **Serra M. 2017.** La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. Revista Habanera de Ciencias Médicas. 16(3): 402-419.
97. **Sharif NM, Sreedevi B, Chaitanya RK, Sreenivasulu D. 2017a.** Beta-lactamase antimicrobial resistance in *Klebsiella* and *Enterobacter* species isolated from healthy and diarrheic dogs in Andhra Pradesh, India. Vet World. 2017a ;10(8):950-954.
98. **Sharif NM, Sreedevi B, Chaitanya RK y Srilatha C. 2017b.** Detection of extended spectrum beta-lactam (ESBL) resistance in *Pseudomonas* species of canine origin. The Pharma Innovation Journal 6 (9): 89-93.
99. **So JH, Kim J, Bae IK, Jeong SH, Kim SH, Lim SK, Park YH, Lee K. 2012.** Dissemination of multidrug-resistant *Escherichia coli* in Korean veterinary hospitals. Diagn Microbiol Infect Dis. 73(2):195-9.
100. **Suárez C, Gudíol F. 2009.** Antibióticos betalactámicos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 27(2):116–129.
101. **Suárez C, Kattán, J, Guzmán A, Villegas M. 2006.** Mecanismos de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *acinetobacter* y *enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. Infectio, 10(2), 85-93.
102. **Sun Y, Zeng Z, Chen S, Ma J, He L, Liu Y, Deng Y, Lei T, Zhao J, Liu J. 2010.** High prevalence of *bla*(CTX-M) extended-spectrum β -lactamase genes in *Escherichia coli* isolates from pets and emergence of CTX-M-64 in China. Clin Microbiol Infect. 16(9):1475-81.
103. **Torres C, Zarazaga M. 2007.** BLEE en animales y su importancia en la transmisión a humanos .Enferm Infecc Microbiol Clin; 2(2):29-37

104. **van der Putten BCL, Matamoros S, Mende DR, Scholl ER, Consortium C, Schultsz C. 2021.** *Escherichia ruysiae* sp. nov., a novel Gram-stain-negative bacterium, isolated from a faecal sample of an international traveller. *Int J Syst Evol Microbiol.* 71(2):004609.
Doi: 10.1099/ijsem.0.004609.
105. **Tenover FC, Mohammed MJ, Gorton TS, Dembek ZF. 1999.** Detection and reporting of organisms producing extended-spectrum beta-lactamases: survey of laboratories in Connecticut. *J Clin Microbiol.* 37(12):4065-70.
106. **Toombs-Ruane LJ, Benschop J, French NP, Biggs PJ, Midwinter AC, Marshall JC, Chan M, Drinković D, Fayaz A, Baker MG, Douwes J, Roberts MG, Burgess SA. 2020.** Carriage of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase- and AmpC Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains from Humans and Pets in the Same Households. *Appl Environ Microbiol.* 86(24):e01613-20.
107. **Tudu R, Banerjee J, Habib M, Bandyopadhyay S, Biswas S, Kesh SS, Maity A, Batabyal S, Polley S. 2022.** Prevalence and molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* isolated from dogs suffering from diarrhea in and around Kolkata. *Iran J Vet Res.* 23(3):237-246.
108. **Tzouvelekis LS, Bonomo RA. 1999.** SHV-type beta-lactamases. *Curr Pharm Des.* 1999 Nov;5(11):847-64.
109. **Ventura M, Oporto R, Espinoza K, Guibert F, Quispe AM, Vilar N, López M, Rojo-Bezares B, Sáenz Y, Ruiz J, J Pons M. 2024.** Antimicrobial resistance and associated risk factors in *Escherichia coli* isolated from Peruvian dogs: A focus on extended-spectrum β -lactamases and colistin. *Vet World.* 17(4):880-887.
110. **Wedley AL, Maddox TW, Westgarth C, Coyne KP, Pinchbeck GL. 2011.** Prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in dogs in a cross-sectional, community-based study. *Vet Rec* 168 (13): 354.
111. **Weill FX, Demartin M, Tandé D, Espié E, Rakotoarivony I, Grimont PA. 2004.** SHV-12-like extended-spectrum-beta-lactamase-producing strains of *Salmonella enterica* serotypes Babelsberg and Enteritidis isolated in France among infants adopted from Mali. *J Clin Microbiol.* 42(6):2432-7.

112. **Werhahn Beining M, Hartmann M, Luebke-Becker A, Guenther S, Schaufler K, Hille K, Kreienbrock L. 2023.** Carriage of Extended Spectrum Beta Lactamase-Producing *Escherichia coli*: Prevalence and Factors Associated with Fecal Colonization of Dogs from a Pet Clinic in Lower Saxony, Germany. *Animals (Basel)*.13(4):584.
113. **Yazdi M, Nazemi A, Mirinargasi M, Jafarpour M, Sharifi S. 2012.** Genotyping versus Phenotyping methods to detect Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBLs) in uropathogenic *Escherichia coli*. *Annals of Biological Research*. 3(5):2454–58.
114. **Yoon EJ, Choi YJ, Won D, Choi JR, Jeong SH. 2024.** *Klebsiella pneumoniae*, a human-dog shuttle organism for the genes of CTX-M ESBL. *Sci Rep*. 14(1):24725.
115. **Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J. 2017.** Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol*.67(5):1613-1617.
Doi: 10.1099/ijsem.0.001755.
116. **Yu D, Banting G, Neumann N. 2021.** A review of the taxonomy, genetics, and biology of the genus *Escherichia* and the type species *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology* 67 (8): 553 – 571.

ANEXOS

ANEXO 1

Lista de cepas utilizadas en el estudio.

CODIGO	CEPA	ESPECIE	HISTORIA CLINICA	FECHA DE INGRESO
E199	<i>K. pneumoniae</i>	Canino	Control rutinario	2021
E201	<i>K. pneumoniae</i>	Canino	Consulta por cuadro respiratorio	2021
E202	<i>K. pneumoniae</i>	Canino	Vacunación	2021
E203	<i>K. pneumoniae</i>	Canino	Control por enfermedad renal	2021
E204	<i>Klebsiella spp.</i>	Canino	Crecimiento de masa en zona cervical	2021
E205	<i>Klebsiella spp.</i>	Canino	Sangrado Vulvar	2021
E206	<i>Klebsiella spp.</i>	Canino	Inapetencia	2021
E207	<i>K. pneumoniae</i>	Canino	Hernia umbilical	2021
E208	<i>Klebsiella spp.</i>	Canino	Control rutinario	2021
E209	<i>K. pneumoniae</i>	Canino	Sospecha de colapso traqueal	2021
E211	<i>K. pneumoniae</i>	Canino	control rutinario	2021
E212	<i>Klebsiella spp.</i>	Canino	Soplo cardiaco	2021
E213	<i>K. pneumoniae</i>	Canino	Control por vacunación	2021
E217	<i>K. pneumoniae</i>	Canino	Inapetencia	2021
EC437	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	2021
EC438	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	2021
EC439	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	2021
EC440	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	2021
EC441	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	2021
EC442	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	2021
EC443	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	2021
EC444	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	2021
EC445	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	2021
EC446	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	2021
EC447	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	2021
EC448	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	2021
EC449	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	2021

CODIGO	CEPA	ESPECIE	HISTORIA CLINICA	FECHA DE INGRESO
EC450	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	2021
EC451	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	2021
EC452	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	2021
EC453	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	2021
EC454	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	2021
EC455	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	2021
EC456	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	2021
EC457	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	2021
EC458	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	2021
EC459	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	2021
EC460	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	2021
EC462	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	2021
EC463	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	2021
EC464	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	2021

ANEXO 2

Protocolo para la extracción de ADN en bacterias gramnegativas.

1. Inocular 2×10^9 células bacterianas en tubos de microcentrífuga de 1.5 a 2 ml de para su posterior centrifugación por 10 min a 5000 x g. El sobrenadante deberá ser desechado
2. El precipitado debe ser suspendido nuevamente en 180 μ L de Solución de Digestión (Buffer de Lisis)
3. Incubar a 56°C, ir agitando hasta que se encuentre lisada por completo, o usar un termomezclador.
4. Adicionar 20 μ L de solución ARNasa A, mezclar la solución con ayuda de un vórtex
5. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente
6. Adicionar 200 μ L de Solución de Lisis y mezclar durante 15 minutos hasta que se encuentre homogenizada.
7. Agregar 400 μ L de etanol al 50% y mezclar.
8. Pasar la mezcla a una columna de Purificación insertado dentro de un tubo de recolección.
9. Centrifugar durante un minuto a 6000 xg. Descartar el tubo recolector y colocar la columna de purificación en un nuevo tubo recolector de 2 ml
10. Agregar 500 μ L de Buffer de Lavado I (c/ Etanol). Centrifugar durante un minuto a 8000 xg. Descartar el tubo y colocar la columna de purificación nuevamente en otro tubo colector.
11. Agregar 500 μ L de Buffer de lavado II (con etanol) en la columna de purificación dentro del nuevo tubo colector. Centrifugar durante 3 minutos a velocidad máxima (>12000 xg). Desechar el contenido del tubo colector nuevamente, y colocarlo dentro de un tubo de microcentrífuga (1.5 ml)
12. Adicionar 200 μ L de Buffer de Elución calentado previamente al medio de la columna de purificación, incubar durante dos minutos a temperatura ambiente y centrifugarlo durante 1 minuto a 8000 xg.
13. Descartar la columna de purificación y utilizar el ADN purificado en los procedimientos necesarios, de lo contrario deberá ser conservado a -20 °C para su posterior uso.

ANEXO 3

Resultados fenotípicos de BLEE en todas las cepas del estudio

Nº	CÓDIGO	CEPA	PRUEBA DE DISCOS COMBINADOS
1	E199	<i>K. pneumoniae</i>	POSITIVO
2	E201	<i>K. pneumoniae</i>	NEGATIVO
3	E202	<i>K. pneumoniae</i>	NEGATIVO
4	E203	<i>K. pneumoniae</i>	NEGATIVO
5	E204	<i>Klebsiella spp.</i>	NEGATIVO
6	E205	<i>Klebsiella spp.</i>	NEGATIVO
7	E206	<i>Klebsiella spp.</i>	POSITIVO
8	E207	<i>K. pneumoniae</i>	POSITIVO
9	E208	<i>Klebsiella spp.</i>	POSITIVO
10	E209	<i>K. pneumoniae</i>	NEGATIVO
11	E211	<i>K. pneumoniae</i>	NEGATIVO
12	E212	<i>Klebsiella spp.</i>	NEGATIVO
13	E213	<i>K. pneumoniae</i>	NEGATIVO
14	E217	<i>K. pneumoniae</i>	NEGATIVO
15	EC437	<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVO
16	EC438	<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVO
17	EC439	<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVO
18	EC440	<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVO
19	EC441	<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVO
20	EC442	<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVO
21	EC443	<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVO
22	EC444	<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVO
23	EC445	<i>Escherichia coli</i>	POSITIVO
24	EC446	<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVO
25	EC447	<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVO
26	EC448	<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVO
27	EC449	<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVO

Nº	CÓDIGO	CEPA	PRUEBA DE DISCOS COMBINADOS
28	EC450	<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVO
29	EC451	<i>Escherichia coli</i>	POSITIVO
30	EC452	<i>Escherichia coli</i>	POSITIVO
31	EC453	<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVO
32	EC454	<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVO
33	EC455	<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVO
34	EC456	<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVO
35	EC457	<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVO
36	EC458	<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVO
37	EC459	<i>Escherichia coli</i>	POSITIVO
38	EC460	<i>Escherichia coli</i>	POSITIVO
39	EC462	<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVO
40	EC463	<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVO
41	EC464	<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVO

ANEXO 4

Presencia de genes de betalactamasas de espectro extendido (*bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*)

Nº	CÓDIGO	CEPA	ESPECIE	HC	BLEE (<i>bla</i>)		
					<i>TEM</i>	<i>SHV</i>	<i>CTX-M</i>
1	E199	<i>K. pneumoniae</i>	Canino	Control rutinario	+	+	+
2	E201	<i>K. pneumoniae</i>	Canino	Consulta por cuadro respiratorio	-	+	-
3	E202	<i>K. pneumoniae</i>	Canino	Vacunación	-	+	-
4	E203	<i>K. pneumoniae</i>	Canino	Control por enfermedad renal	-	-	-
5	E204	<i>Klebsiella</i> spp.	Canino	Crecimiento de masa en zona cervical	-	-	+
6	E205	<i>Klebsiella</i> spp.	Canino	Sangrado Vulvar	+	-	+
7	E206	<i>Klebsiella</i> spp.	Canino	Inapetencia	+	-	+
8	E207	<i>K. pneumoniae</i>	Canino	Hernia umbilical	-	+	-
9	E208	<i>Klebsiella</i> spp.	Canino	Control rutinario	+	-	+
10	E209	<i>K. pneumoniae</i>	Canino	Sospecha de colapso traqueal	-	+	-
11	E211	<i>K. pneumoniae</i>	Canino	control rutinario	-	+	-
12	E212	<i>Klebsiella</i> spp.	Canino	Soplo cardiaco	+	-	+
13	E213	<i>K. pneumoniae</i>	Canino	Control por vacunación	-	+	-
14	E217	<i>K. pneumoniae</i>	Canino	Inapetencia	-	+	-
15	EC437	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	+	-	-
16	EC438	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	-	-	-
17	EC439	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	-	-	-
18	EC440	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	-	-	+
19	EC441	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	-	-	+
20	EC442	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	-	-	+
21	EC443	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	-	+	+
22	EC444	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	-	-	+
23	EC445	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	+	-	+
24	EC446	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	-	+	-
25	EC447	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	+	-	-
26	EC448	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	-	-	+
27	EC449	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	-	-	-

N°	CÓDIGO	CEPA	ESPECIE	HC	BLEE (<i>bla</i>)		
					<i>TEM</i>	<i>SHV</i>	<i>CTX-M</i>
28	EC450	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	-	-	-
29	EC451	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	-	-	+
30	EC452	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	+	-	+
31	EC453	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	+	-	-
32	EC454	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	-	-	-
33	EC455	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	-	-	-
34	EC456	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	-	-	-
35	EC457	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	-	-	-
36	EC458	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	-	-	-
37	EC459	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	+	-	+
38	EC460	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	+	-	+
39	EC462	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	-	-	-
40	EC463	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	-	-	-
41	EC464	<i>Escherichia coli</i>	Canino	Sin Historia Clínica	-	-	-