



**UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR**  
**Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del**  
**Ambiente**  
**Carrera de Medicina Veterinaria**

**Tema:**

**“DETERMINACIÓN *in vitro* DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO  
EXTENDIDO (BLEE) PRODUCIDAS POR *Escherichia coli* Y *Klebsiella*  
*spp.*, AISLADAS DE MASTITIS BOVINA MEDIANTE LA TÉCNICA DE  
KIRBY-BAUER”**

Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Médico Veterinario, otorgado por la Universidad Estatal de Bolívar a través de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Carrera de Medicina Veterinaria

**Autor:**

**FABRICIO DANIEL ROGEL PRADO**

**Tutor:**

**DR. EDISON RIVELIÑO RAMÓN CURAY M.Sc.**

**Guaranda – Ecuador**

**2024**

**CERTIFICADO DE APROBACIÓN DEL TUTOR**

"DETERMINACIÓN *in vitro* DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO  
EXTENDIDO (BLEE) PRODUCIDAS POR *Escherichia coli* Y *Klebsiella*  
*spp.*, AISLADAS DE MASTITIS BOVINA MEDIANTE LA TÉCNICA DE  
KIRBY-BAUER"

**REVISADO Y APROBADO POR:**

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized 'R' and 'C' intertwined, written over a horizontal dashed line.

DR. EDISON RIVELIÑO RAMÓN CURAY M.Sc.

**TUTOR**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Favian Bayas', written over a horizontal dashed line.

DR. FAVIAN BAYAS M.Sc.

**PAR LECTOR**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Jagger Segura', written over a horizontal dashed line.

DR. JAGGER SEGURA PhD

**PAR LECTOR**

## CERTIFICACIÓN DE AUTORIA

Yo, FABRICIO DANIEL ROGEL PRADO con CI 1105485526, declaro que el trabajo y los resultados presentados en este informe, no han sido previamente presentados para ningún grado o calificación profesional; y, que las referencias bibliográficas que se incluyen han sido consultadas y citadas con su respectivo autor(es).

La Universidad Estatal de Bolívar, puede hacer uso de los derechos de publicación correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, su Reglamentación y la Normativa Institucional vigente.



FABRICIO DANIEL ROGEL PRADO



**AUTOR**



DR. EDISON RIVELIÑO RAMÓN CURAY M.Sc

**TUTOR**

ESCRITURA N° 20230201004P00967

DECLARACIÓN JURAMENTADA

OTORGA:  
FABRICIO DANIEL ROGEL PRADO  
CUANTÍA: INDETERMINADA  
Di 2 COPIA

En el Cantón Guaranda, Provincia de Bolívar, República del Ecuador, hoy miércoles a los veintinueve días del mes de noviembre del año dos mil veintitrés, ante mí DOCTORA MSC. GINA LUCIA CLAVIJO CARRIÓN, NOTARIA CUARTA DEL CANTÓN GUARANDA comparece con plena capacidad, libertad y conocimiento, a la celebración de la presente escritura, el señor FABRICIO DANIEL ROGEL PRADO, por sus propios y personales derechos. El compareciente declara ser de nacionalidad ecuatoriana, mayor de edad, de estados civil soltero, de ocupación estudiante, domiciliado en la parroquia Angel Polibio Chaves, cantón Guaranda, Provincia Bolívar, con celular número cero nueve ocho cuatro ocho siete nueve cuatro uno cuatro; y, con correo electrónico [fabriciorogel0709@gmail.com](mailto:fabriciorogel0709@gmail.com), hábil en derecho para contratar y contraer obligaciones, a quien de conocer doy fe, en virtud de haberme exhibido sus documentos de identificación, en base a lo cual obtengo la certificaciones de datos biométricos del Registro Civil, mismos que agrego a esta escritura como documentos habilitantes. Advertido el compareciente por mí la Notaria de los efectos y resultados de esta escritura, así como examinado que fue en forma aislada y separada de que comparece al otorgamiento de esta escritura sin coacción, amenazas, temor reverencial, ni promesa o seducción, advertida la compareciente de la obligación de decir la verdad y conocedor de la penas de perjurio declara: Yo, FABRICIO DANIEL ROGEL PRADO, de estado civil soltero, portador de la cédula de ciudadanía número uno uno cero cinco cuatro ocho cinco cinco dos Guion seis, declaro juramento que: Los criterios e ideas emitidos en el presente trabajo de investigación titulado "DETERMINACIÓN *in vitro* DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) PRODUCIDAS POR *Escherichia coli* Y *Klebsiella spp.*, AISLADAS DE MASTITIS BOVINA MEDIANTE LA TÉCNICA DE KIRBY-BAUER". El trabajo aquí escrito es de mi autoría y por lo tanto soy responsable de las ideas y contenidos expuestos en el mismo y autorizo a la Universidad Estatal de Bolívar a hacer uso de todos los contenidos que me pertenecen o parte de lo que contiene la obra, con fines estrictamente académicos o de investigación expuestos en el mismo. En el proyecto de investigación previo a la obtención del título de MEDICO VETERINARIO, otorgado por la Universidad Estatal de Bolívar, a través de la Facultad de CIENCIAS AGROPECUARIAS, RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE, Carrera de Medicina Veterinaria. Es todo cuanto puedo declarar en honor a la verdad. Para su celebración y otorgamiento se observaron los preceptos de ley que el caso requiere; y, leída que le fue al compareciente íntegramente por mí la Notaria, aquel se ratifica en todas sus partes y firma junto conmigo en unidad de acto, se incorpora al protocolo de esta Notaria, la presente declaración juramentada, de todo lo cual doy Fe. -----

  
SR. FABRICIO DANIEL ROGEL PRADO,  
C.C. 1105485526

  
DOCTORA MSc. GINA CLAVIJO CARRION,  
NOTARIA CUARTA DEL CANTÓN GUARANDA.



NOMBRE DEL TRABAJO

**INFORMACIÓN AGRONOMÍA.docx**

AUTOR

**FABRICIO DANIEL ROGEL PRADO**

RECUENTO DE PALABRAS

**12631 Words**

RECUENTO DE CARACTERES

**71294 Characters**

RECUENTO DE PÁGINAS

**56 Pages**

TAMAÑO DEL ARCHIVO

**380.7KB**

FECHA DE ENTREGA

**Nov 28, 2023 9:37 PM GMT-5**

FECHA DEL INFORME

**Nov 28, 2023 9:38 PM GMT-5****● 9% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base

- 2% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 3% Base de datos de trabajos entregados
- 4% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Cross

## **DEDICATORIA**

Esta investigación se la dedico sin duda alguna a mis padres, ellos en todo momento confiaron y tenían la certeza de que lo lograría, por toda la comprensión y sacrificio que hicieron, a mis hermanos por ser mis acompañantes y brindarme el apoyo íntegro que necesitaba en todo este proceso de mis estudios profesionales, a toda mi familia por estar ahí completamente en varias ocasiones difíciles que se me han presentado y a aquellas personas que de una u otra manera estuvieron apoyándome a lo largo de todos estos años.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios por haberme acompañado en mi carrera, por darme la sabiduría y fortaleza para alcanzar mi meta.

Al Dr. Ramón Rivelino, Tutor de Tesis, hago llegar mi más sincero Agradecimiento al permitirme ser partícipe de una de sus investigaciones en la Universidad, de igual manera al Dr. Joscelito Solano, Coordinador de integración curricular, también a los lectores de mi trabajo de investigación, Dr. Fabián Bayas y Dr. Jagger Segura, quienes colaboraron directamente en la tesis.

A mis padres, Ulvio José Rogel Macas y Livia María Prado Sánchez, en especial a mi madre que se ha convertido en uno de los pilares fundamentales e indispensables en mi formación profesional, por aquella confianza, consejos y ayuda incondicional durante mis estudios.

A mis hermanos, Neydi Rogel y Jonathan Rogel, por ser amigos y apoyarme diariamente a través de sus consejos, perseverancia y responsabilidad.

Un agradecimiento a los docentes que me acompañaron a lo largo de mis estudios, compañeros y amigos, que me brindaron su apoyo y consejos para no rendirme y conseguir llegar a esta meta planteada.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

CONTENIDO	PAG.
CAPÍTULO I .....	1
1.1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.2. PROBLEMA .....	2
1.3. OBJETIVOS .....	3
1.4. HIPÓTESIS .....	4
CAPÍTULO II .....	5
2. MARCO TEORICO .....	5
2.1. La mastitis.....	5
2.1.1. <i>Escherichia coli</i> patogénica mamaria .....	6
2.1.2. <i>Klebsiella</i> spp y su relación con la mastitis .....	9
2.2. Roll terapéutico de los antibióticos con la mastitis .....	10
2.2.1. Antibacterianos $\beta$ -talactámicos.....	11
2.2.2. Distribución de los antibióticos $\beta$ -lactámicos .....	13
2.3. Mecanismos de resistencias.....	16
2.4. Producción de betalactamasas .....	17
2.4.1. Categorización de las betalactamasas .....	18
2.4.2. Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) .....	18
2.5. Pruebas fenotípicas para la detección.....	19
CAPÍTULO III.....	21
3. MARCO METODOLÓGICO .....	21
3.1. Ubicación y características de la investigación .....	21
3.2. Metodología.....	22
3.2.1. Material Experimental. ....	22



3.2.2.	Factores en estudio.....	22
3.2.3.	Tratamientos .....	23
3.2.4.	Tipo de diseño experimental o estadístico. ....	24
3.2.5.	Manejo del experimento.....	25
3.2.6.	Métodos de evaluación y datos a tomar .....	27
CAPÍTULO IV.....		29
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	29
4.1.	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	29
4.1.1.	Perfiles de identificación de las bacterias en estudio.....	29
4.1.2.	Susceptibilidad y resistencia de los patógenos .....	30
4.1.2.1.	ADEVA del efecto de los betalactámicos en estudio versus <i>Escherichia coli</i> obtenida de mastitis bovina.....	30
4.1.2.1.1.	Categorización interpretativa de la susceptibilidad de <i>Escherichia coli</i> expuesta a los betalactámicos investigados .....	32
4.1.3.	Perfil de producción de betalactamasas de espectro extendido por parte <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella</i> spp., obtenidas de mastitis bovina .....	42
4.1.4.	Índice de prevalencia de las enterobacterias productores de betalactamasas de espectro extendido.....	44
4.2.	COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS.....	47
CAPÍTULO V .....		48
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	48
5.1.	CONCLUSIONES .....	48
5.2.	RECOMENDACIONES .....	49
BIBLIOGRAFÍA .....		50

## ÍNDICE DE TABLAS

Nº	DETALLE	PAG.
1.	Distribución taxonómica de <i>E. coli</i> .....	6
2.	Distribución taxonómica de <i>Klebsiella</i> spp.....	9
3.	Clasificación de las betalactamasas de espectro extendido.....	19
4.	Puntos de corte para los antibióticos usados para determinación de BLEE. ....	20
5.	Descripción del aplicativo de los tratamientos.....	23
6.	Particularidades numéricas de la investigación .....	24
7.	Fuentes de estudio del ADEVA .....	24
8.	Perfiles de identificación de las bacterias en estudio.....	29
9.	ADEVA del impacto de los betalactámicos sobre cepas de <i>E. coli</i> .....	30
10.	Promedios de las zonas de inhibición de los betalactámicos frente a <i>E. coli</i> . .	30
11.	Medidas de los criterios categóricos de los antibióticos usados en las pruebas de susceptibilidad de <i>E. coli</i> .....	32
12.	Resultados de las pruebas de susceptibilidad de <i>E. coli</i> .....	33
13.	Índice de susceptibilidad de <i>E. coli</i> con respecto los betalactámicos .....	34
14.	ADEVA del impacto de los betalactámicos en cepas de <i>Klebsiella</i> spp.....	36
15.	Promedios de las zonas de inhibición de los betalactámicos frente a <i>Klebsiella</i> spp., obtenida de mastitis bovina. ....	36
16.	Medidas de los criterios categóricos de los antibióticos usados en las pruebas susceptibilidad de <i>Klebsiella</i> spp. ....	38
17.	Resultados de las pruebas de susceptibilidad de <i>Klebsiella</i> spp. ....	39
18.	Índice de susceptibilidad de <i>Klebsiella</i> spp. con respecto los betalactámicos estudiados.....	40
19.	Caracterización de betalactamasas de <i>E. coli</i> y <i>Klebsiella</i> spp.....	42
20.	Prevalencia de los patógenos productores de BLEE.....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Nº</b>	<b>DETALLE</b>	<b>PAG.</b>
1.	Mastitis bovina causada por MPEC. ....	8
2.	Promedios de las regiones inhibitorias de los betalactámicos usados con respecto a E. coli obtenidas de mastitis bovina. ....	31
3.	Índice de susceptibilidad antimicrobiana de E. coli con respecto a los betalactámicos estudiados. ....	35
4.	Promedios del impacto inhibitorio de los betalactámicos usados frente a Klebsiella spp., aislada de mastitis bovina. ....	37
5.	Índice de susceptibilidad antimicrobiana de Klebsiella spp con respecto a los betalactámicos estudiados. ....	41
6.	Caracterización fenotípica de BLEE en E. coli y Klebsiella spp., causante de mastitis.....	44

## ÍNDICE DE ANEXOS

Nº

DETALLE

1. Mapa de ubicación de la investigación.....
2. Base de datos.....
3. Fotografías de la investigación.....
4. Glosario de términos .....

## RESUMEN

La mastitis bovina últimamente es considerada como una de las enfermedades infecto-contagiosa de gran perjuicio para la salud pública, debido a que se ha estimado que puede ser el punto de partida para reservar agentes infecciosos de fácil diseminación desde el animal hacia el ser humano o viceversa. El presente trabajo investigativo está enfocado en determinar in vitro la presencia de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) producidas por parte de *Klebsiella* spp., y *Escherichia coli*, identificadas de casos de mastitis, mediante pruebas de susceptibilidad antibacteriana (Kirby-bauer). Metódicamente el cumplimiento de este objetivo se desarrolló por aplicación de métodos fenotípicos en la interacción antibacteriana en las pruebas de susceptibilidad, por lo cual se estudió el efecto sinérgico de doble disco, aumento de 5 milímetros en la medida de las áreas inhibidas propiciado por el inhibidor de las betalactamasas y crecimiento en placa con medio de cultivo más antibiótico, para su efecto se utilizó 6 cepas de *Klebsiella* y 6 cepas de *Escherichia coli*, las cuales fueron expuestas a los discos de antibióticos de; amoxicilina más ácido clavulánico (AMC 30µg), cefpodoxima (CPD 30µg), ceftazidima (CAZ 30µg), cefotaxima (CTX 30µg), ceftriaxona (CRO 30µg) y aztreonam (ATM 30µg), así mismo, se utilizó los discos de CAZ y CTX más ácido clavulánico (CLA), adicionalmente se expuso dichos microorganismos a una concentración de 1 mg de ceftriaxona por cada litro de medio de cultivo para observar su crecimiento. Determinando que 2 cepas de *E. coli* fueron sensibles a todos los fármacos en estudio, 2 cepas expresaron resistencias a las cefalosporinas de tercera generación y exhibieron un aumento en diámetro del área de inhibición al ser expuestas al inhibidor de betalactamasas, no obstante, las 2 cepas restantes expresaron resistencia total a los fármacos estudiados, en el caso de *Klebsiella* spp., manifestó que las 6 cepas fueron resistentes a las cefalosporinas de tercera generación, de las cuales solo 1 expresó un aumento en el diámetro del área de inhibición en respuesta al inhibidor. Finiquitando que mediante la caracterización se pudo identificar una prevalencia total del 25%, observando que el 33.33% *Escherichia coli* y el 16.67% *Klebsiella* spp., fueron productores de BLEE, adicionalmente se determinó que 7 cepas producen otro tipo de betalactamasas.

**Palabras Claves:** BLEE, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, Kirby-bauer, Antibiótico.

## SUMMARY

Bovine mastitis is lately considered as one of the infectious-contagious diseases of great detriment to public health, because it has been estimated that it can be the starting point for reserving infectious agents of easy dissemination from the animal to the human being or vice versa. The present research work is focused on determining in vitro the presence of extended spectrum beta-lactamases (BLEE) produced by *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli*, identified from cases of mastitis, by means of antibacterial susceptibility tests (Kirby-bauer). Methodically the fulfillment of this objective was developed by application of phenotypic methods in the antibacterial interaction in the susceptibility tests, for which the synergistic effect of double disc was studied, increase of 5 millimeters in the measurement of the inhibited areas caused by the inhibitor of beta-lactamases and growth in plate with culture medium plus antibiotic, for its effect 6 strains of *Klebsiella* and 6 strains of *Escherichia coli* were used, which were exposed to the antibiotic discs of; amoxicillin plus clavulanic acid (AMC 30µg), cefpodoxime (CPD 30µg), ceftazidime (CAZ 30µg), cefotaxime (CTX 30µg), ceftriaxone (CRO 30µg) and aztreonam (ATM 30µg), as well, CAZ and CTX discs plus clavulanic acid (CLA) were also used, and these microorganisms were exposed to a concentration of 1 mg of ceftriaxone per liter of culture medium to observe their growth. It was determined that 2 strains of *E. coli* were sensitive to all the drugs under study, 2 strains expressed resistance to third generation cephalosporins and exhibited an increase in the diameter of the inhibition area when exposed to the beta-lactamase inhibitor; however, the remaining 2 strains expressed total resistance to the drugs studied, in the case of *Klebsiella* spp, showed that the 6 strains were resistant to third generation cephalosporins, of which only 1 expressed an increase in the diameter of the inhibition area in response to the inhibitor. Finally, by means of the characterization it was possible to identify a total prevalence of 25%, observing that 33.33% of *Escherichia coli* and 16.67% of *Klebsiella* spp. were BLEE producers; additionally, it was determined that 7 strains produced other types of beta-lactamases.

**Key words:** BLEE, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, Kirby-bauer, Antibiotic

## CAPÍTULO I

### 1.1. INTRODUCCIÓN

Dentro de los componentes del bienestar animal de las vacas lecheras se encuentran como pilares la salud y el ambiente, estos dos se encuentran en íntima relación el uno con el otro, teniendo implicaciones potenciales para el desarrollo de patologías infecciosas en primera instancia, primordialmente las patologías de mayor relevancia en este estrato productivo giran en torno a la ubre de la vaca, en donde, la mastitis es la principal involucrada (Bianchi *et al.*, 2019).

Generalmente aquellos patógenos ambientales Gram-negativos como *Klebsiella* spp., y *Escherichia coli* son potenciales etiologías que ocasionan cuadros mastíticos agudos e hiperagudos significativos asociados a ambientes con un manejo sanitario deficiente, cada uno de estos agentes patógenos poseen características adaptativas y factores de virulencia propios, en donde se destacan la producción de sustancias citotóxicas y enzimas que les confieren resistencia a los componentes inmunológicos del animal y al antibiótico (Cruz *et al.*, 2020).

La resistencia a los antimicrobianos se podría asociar a cuando los antibióticos fueron descubiertos en 1928 por parte del médico humano Alexander Fleming, quien descubrió la forma en que ciertos microbios eran inhibidos por la penicilina, se sabe que esto es el punto de partida de las terapias con antibióticos para las infecciones, la mastitis no es excluida de dicho enfoque terapéutico, ya que los antibióticos son la primera línea farmacológica seleccionada, negativamente con el paso del tiempo y la mala administración de dichos agentes medicamentosos, los índices de curación han disminuido, esto por la adaptabilidad que tienen ciertos patógenos para generar mecanismos de resistencias (Krömker & Leimbach, 2017).

El desarrollo de mecanismos de resistencia se ha debido a la continua exposición de las bacterias a los antimicrobianos, uno de ellos es la producción de enzimas hidrolizantes como las BLEE por parte de *Klebsiella* spp. y *E. coli*, las cuales pueden hidrolizar el anillo betalactámico presente en la estructura química de los fármacos betalactámicos, este antecedente se observaba con mayor recurrencia en ambientes hospitalarios por lo que se asumían eran nosocomiales (Campos *et al.*, 2022).

## 1.2. PROBLEMA

El ganado bovino es considerado como uno de los reservorios de mayor importancia de patógenos multiresistentes, considerando que la susceptibilidad de la vaca lechera en ciertos periodos de su etapa productiva es el punto crítico para que estos patógenos colonicen determinados tejidos, en donde la ubre no se excluye de dicha posibilidad. La toleración de los patógenos a la terapéutica antibiótica suministrada se traduce en la aparición de cuadros incurables de mastitis que generalmente conllevan a la baja producción y al descarte de animales con merito productivo.

En dependencia de la modulación en la respuesta inflamatoria del sistema mamario se puede observar cuadros mastíticos agudos e hiperagudos que perjudican a la rentabilidad de la unidad productiva los cuales habitualmente estan producidos por potenciales cepas bacterianas resistentes a los antibióticos, el perjuicio económico se encuentra distribuido en un 36% a pérdidas por descarte de leche con medicamentos, descartes prematuros de animales con merito productivo, costos en medicamentos además de honorarios profesionales lo que consecuentemente se traduce en trabajos extra, el 64% restante a pérdidas en la disminución de la producción láctea ocasionado por la fisiopatología de la enfermedad lo que se encuentra desvinculado a la resistencia antimicrobiana.

Un mecanismo de resistencia antibiótica identificado es la producción de enzimas hidrolizantes como las BLEE por parte de determinadas cepas bacterianas como la *Klebsiella* spp. y *Escherichia coli* siendo estas sustancias bacterianas las responsables de inhibir el mecanismo de acción de un antibiótico que generalmente se identifica como Betalactámico evidenciando el aumento de a morbilidad y mortalidad dentro de un hato lechero.

La escasa o nula disponibilidad de información sobre estudios epidemiológicos de la población bacteriana causante de cuadros mastíticos y sus mecanismos de resistencia a determinados fármacos es considerado un punto negativo en la salud tanto animal como humana ya que existe un potencial riesgo zoonótico que involucra a las bacterias resistentes o determinantes genéticos a partir de productos de origen animal con limitada aplicación de procesos de industrialización e inocuidad a través de la cadena alimentaria.



### **1.3. OBJETIVOS**

#### **1.3.1. Objetivo General**

Determinar in vitro la presencia de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) producidas por *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp., aisladas de mastitis bovina mediante la técnica de Kirby-bauer.

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

- Identificar bioquímicamente aislados de *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp., aislados de mastitis bovina.
- Determinar la sensibilidad y resistencias antimicrobiana de *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp., frente a cefpodoxima, ceftazidima, aztreonam, cefotaxima y ceftriaxona.
- Caracterizar la producción de betalactamasas de espectro extendido por parte *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp., aislados de mastitis bovina mediante la técnica de difusión de disco.
- Estimar la tasa de prevalencia de los aislados productores de betalactamasas de espectro extendido.

#### **1.4. HIPÓTESIS**

**HO:** No existe producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) identificadas mediante pruebas fenotípicas de susceptibilidad por parte de *Klebsiella* spp., y *Escherichia coli* responsables de mastitis.

**HI:** Existe producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) identificadas mediante pruebas fenotípicas de susceptibilidad por parte de *Klebsiella* spp., y *Escherichia coli* responsables de mastitis.

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO TEORICO

#### 2.1. La mastitis

Históricamente se sabe que las vacas han sido ordeñadas desde al menos 3100 años a.C. y desde entonces es probable que exista la mastitis bovina, ya que tenían poco conocimiento sobre sus causas y tratamiento (Ruegg, 2017). La mastitis bovina es la inflamación del tejido glandular mamario de las vacas, causada por un invasión y destrucción de los tejidos productores de leche por microorganismos patógenos (Mushtaq *et al.*, 2018).

En las vacas lecheras ocurren infecciones intramamarias que también son conocidas como mastitis, es una enfermedad originada por microorganismos bacterianos, los cuales pueden ser patógenos contagiosos o ambientales que dan inicio a interacciones inflamatorias del epitelio secretor de leche, el curso de esta enfermedad puede ser sintomática o asintomática, es conocido que la mastitis con síntomas visibles como alteraciones físicas de la leche y síntomas perceptibles en la ubre y algunas veces de manera sistémica en el animal (Oliveira *et al.*, 2022).

Se estima que alrededor de 140 especies de microorganismos desencadenan mastitis, dentro de este pool de microorganismos existe un sinnúmero de fuentes causantes, esta diversidad etiológica dificulta el diagnóstico ocasionando pérdidas económicas, por lo tanto es necesario un abordaje meticuloso para la detección del agente causal (Motaung *et al.*, 2017).

Las bacterias que ocasionan mastitis sobreviven en diferentes nichos ambientales, difiriendo unas de otras en su mecanismo de transmisión e infección y en la dificultad con que pueden ser controladas, como los microorganismos contagiosos (*Mycoplasma* spp., *S. agalactiae*, *S. aureus*) quienes en mayor medida colonizan los pezones y acceden al ambiente interno de la ubre, debido a su capacidad de contagio al pasar de vaca a vaca al momento del ordeño o poco después, los microorganismos llamados “ambientales” (*Pseudomonas*, *E. coli*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, etc.), pueden situarse en los lugares de alojamiento de las vacas, y de manera exacerbada donde existe un alto contenido de materia orgánica como heces,

humedad, lodo, restos de forrajes, etc., estos patógenos suelen esperar el momento de mayor susceptibilidad de la vaca para ocasionar la enfermedad y en dependencia de este factor clínico, la patología puede ser persistentes a lo largo del ciclo productivo (Stempler *et al.*, 2022).

### 2.1.1. *Escherichia coli* patogénica mamaria

Es una bacteria anaerobia facultativa es decir que puede sobrevivir en condiciones atmosféricas con CO<sub>2</sub> relativamente mayor a las concentraciones de O<sub>2</sub>, su forma se asemeja a la de un bastón, esta bacteria es móvil y se observa mediante microscopia como un Gram-negativo, generalmente es considerado como una enterobacteria que habita en el intestino de los humanos y animales además de ambientes contaminados (Vega *et al.*, 2019).

**Tabla 1.**

*Distribución taxonómica de E. coli.*

<b>Reino</b>	Bacteria
<b>Filo</b>	Proteobacterias
<b>Clase</b>	Gammaproteobacterias
<b>Orden</b>	Enterobacteriales
<b>Familia</b>	Enterobacteriaceae
<b>Género</b>	<i>Escherichia</i>
<b>Especie</b>	<i>coli</i>
<b>Nombre científico</b>	<i>Escherichia coli</i>

Fuente: ITIS (Integrated taxonomic information system), (2023).

Existen numerosos grupos patógenos donde básicamente se clasifican de acuerdo a la identificación antigénica, en la actualidad se ha logrado serotipificar a *E. coli* según su patogenicidad, definiendo la presencia de 176 características inmunógenas de tipo somático presentes en la bacteria, incluyen la caracterización de 60 involucrados a su capsula, 112 a sus apéndices de locomoción o flagelos (Zhang *et al.*, 2018).

*E. coli* es el patógeno más abundante en ambientes contaminados, se considera como responsable o protagonista de provocar infecciones mamarias en los periodos de mayor compromiso inmunitario de la vaca, en la actualidad se a clasificado a estas bacterias como *E. coli* patogénica mamaria (MPEC), dentro de esta especie bacteriana existe diversidad intraespecífica encontrándose un total de 8 grupos filogenéticos identificados A, B1, B2, C, D, E, F y G, en donde la mayoría de aislamientos de MPEC se encuentran asociados al filogrupo A o B1. Genéticamente las *E. coli* patogénica mamaria MPEC se diferencian de las demás *E. coli* por una amplia variedad de genes responsables de codificar uno o varios factores de virulencia como toxinas, adhesinas, sideróforos, protactinas y lipopolisacáridos (Lindstedt *et al.*, 2018).

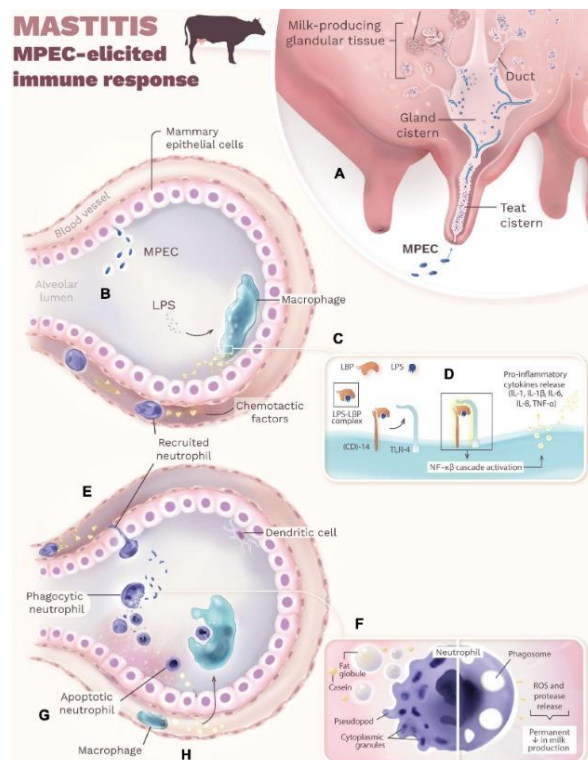
A nivel intramamario la *E. coli* patogénica mamaria la liberación de citoquinas proinflamatorias derivadas del ácido araquidónico y ciclooxigenasas (COX1, COX-2) esto efecto de la disrupción de la membrana celular de las células epiteliales cuando son incididas por ciertos factores de virulencia de la *E. coli* como sus lipopolisacáridos, esta cascada de citoquinas inducen una respuesta defensiva de carácter inmunitario por parte de los linfocitos T, y el receptor toll-like4 (TLR4) el cual se encuentra en posición transmembrana en las células presentadoras de antígenos, este es el encargado de estimular la generación de quimiocinas como la interleucina 8 (IL-8 y RANTES), interleucina 6 y 1 beta (IL-6 e IL-1  $\beta$ ), las que provocan una daño en las células epiteliales mamarias (Zaatout , 2022).

La predisponencia del huésped, en este caso la vaca lechera, influye de manera directa en la presentación de signos clínico específicos que se presentan cuando *E. coli* coloniza el ambiente intramamario, considerando que para esto debe ocurrir situaciones primarias como compromiso inmunológico, disfunción de los polimorfonucleares, estrés metabólico y nutricional, etc., todo esto influye en medida variable para propiciar que *E. coli* pueda transferirse de la leche al ambiente intracelular de las células epiteliales, debido a factores de virulencia importantes como la capacidad de adhesión e invasión de dicha células para cronificar y persistir la infección (Blum *et al.*, 2020)

La capacidad fermentativa de la *E. coli* se ve favorecida por la presencia de la lactosa presente en la secreción láctea de las cisternas mamarias, esta se considera la principal vía de provisión de energía para la bacteria y un punto contraproducente para el control de mastitis por *E. coli*, cuando este patógeno ha alcanzado un número poblacional alto, algunas cepas pueden adherirse al epitelio de la glandula aventajando ciertas reacciones citotóxica y desencadenando la liberación de sustancias defensivas lo que consecuentemente lleva a la fagocitosis del patógeno, sim embargo, *E. coli* patogénica mamaria cuando es lisada se liberan los lipopolisacaridos (LPS) lo que activara a los macrófagos quienes tiene un receptor de dicho antígeno, activando una cascada de señalización intracelular incluida la liberación de citosinas proinflamatorias como interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8 y Factor de necrosis tumoral TNF-  $\alpha$ ) sabiendo que este ultimo induce el shock endotóxico en los casos superagudos, estos eventos desencadenan el reclutamiento de neutrófilos desde la circulación propiciando otros eventos de opsonización (Goulart & Mellata, 2022).

**Figura 1.**

*Mastitis bovina causada por MPEC.*



Fuente: Goulart & Mellata (2022).

La integridad del pezón y su esfínter son la piedra angular para la invasión de *E. coli* hacia el interior de la glándula mamaria, en donde encuentra el microambiente y los medios necesarios para diseminarse y adherirse al tejido secretor donde se manifestarán sus factores de virulencia (Zaatout , 2022).

### 2.1.2. *Klebsiella* spp y su relación con la mastitis

Son patógenos importantes de características oportunistas considerado como un agente bacteriano de tipo ambiental, su morfología característica es similar a un bastón o barrillas de longitud variable, este microorganismo cuando es teñido con los colorantes de Gram, se identifica como Gramnegativo, la teoría menciona que la casuística de mastitis por *Klebsiella* se vincula de un 2% a 9% (Massé *et al.*, 2020).

**Tabla 2.**

*Distribución taxonómica de Klebsiella spp.*

<b>Reino</b>	Bacteria
<b>Filo</b>	Proteobacterias
<b>Clase</b>	Gammaproteobacterias
<b>Orden</b>	Enterobacteriales
<b>Familia</b>	Enterobacteriaceae
<b>Género</b>	<i>Klebsiella</i>
<b>Especie</b>	<i>granulomatis</i> <i>oxytoca</i> <i>pneumoniae</i> <i>singaporensis</i>
<b>Nombre científico</b>	<i>Klebsiella spp.</i>

Fuente: ITIS (Integrated taxonomic information system), (2023).

La mastitis ocasionada por *Klebsiella* spp., tienen características patogénicas enlongadas que generalmente produce cuadros mastíticos graves, reincidentes y de larga duración que provocan una considerable disminución de leche en las vacas, esto y otros factores influyen a la cronicidad del cuadro (Liu *et al.*, 2022).

Este patógeno posee numerosos factores de virulencia que caracterizan su presentación en los cuadros de mastitis que provoca, uno de los más importantes es la capacidad de invasión y adhesión intracelular de las células secretoras productoras a tal punto de considerarse como un factor crítico que le confiere a este patógeno la posibilidad de sobrepoblar la citoarquitectura intramamaria, ya que en primera instancia la invasión intracelular le otorga protección de la fagocitosis y de los mecanismo de defensa humoral y celular de la ubre, consecuentemente cuando *Klebsiella* invade a las células epiteliales de manera intracelularmente, desencadena la liberación de mediadores proinflamatorios debido principalmente a que estas células desempeñan la ocupación de custodios, tienden a sufrir apoptosis mediadas los factores de virulencia de esta bacteria, esto se traduce a la migración de polimorfonucleares desde circulación, incrementando la interacción citotóxica en los alveolos mamarios, resultando en un daño celular permanente que ocasionalmente se traduce en descarte de los animales (Cheng *et al.*, 2020).

*Klebsiella* debe su patogenicidad a ciertos componentes genéticos que permiten la expresión de determinados factores de virulencia como la K1, K2, megA (componente genético asociado a la producción de mucoviscosidad en los serotipos K1), *uGe* (gen que codifica la expresión y producción la iridina difosfato galactosa 4 epimerasa, responsable de la producción y reducción de la capsula y de los lipopolisacáridos lisos), Kfu (gen responsable de la capitación de hierro) y el gen *rmpA* (regulador de la producción de mucoviscosidad) (Massé *et al.*, 2020).

## **2.2. Roll terapéutico de los antibióticos con la mastitis**

En dependencia del microorganismo vinculado en el desarrollo de esta patología se puede presentar un sinnúmero de condiciones que repercuten en el estado fisiológico de la vaca, siendo en algunos casos una enfermedad contagiosa que resulta económicamente importante para la unidad productiva, estrictamente las vacas que presentan disfunción mamaria y mastitis deben ser tratados adecuadamente para reducir el impacto de la enfermedad en su bienestar, existen bacterias que dificultan su control ocasionando disminución en los índices de curación, presencia de trazas medicamentosas en la leche, incremento de la resistencia a los antimicrobianos, etc. (Kayitsinga *et al.*, 2017).



Las decisiones terapéuticas de esta patología deben ser precisas y esta ajustadas a los resultados del cultivo, identificación bacteriana y antibiograma, en casos crónicos donde se observan cambios físicos y en la apariencia de la leche como en la anatomía de la ubre con evidencia de signos inflamatorios (Dolor, Rubor, Calor, tumefacción y signo de Virchow), el enfoque terapéutico debe ser orientado a la administración sistémica de antibióticos, fluidoterapia y administración de antiinflamatorios no esteroideos y esteroideos en dependencia de las condiciones fisiológicas de la vaca. En aquellas mastitis ocasionadas por enterobacterias se recomienda la administración parenteral de fluoroquinolonas (Enrofloxacin, danofloxacin, marbofloxacin) o cefalosporinas de tercera generación (Ceftiofur) (Poizat *et al.*, 2017).

### **2.2.1. Antibacterianos $\beta$ -talactámicos**

Los agentes medicamentosos señalados como  $\beta$ -lactámicos deben su denominación debido a que en su disposición química poseen la estructura o anillo betalactámico, el cual diferencia a esta clasificación de antibióticos, de otros, estos medicamentos antibacterianos son unos de los mas utilizados dentro de las elecciones terapéuticas debido a su reducido impacto tóxico a nivel orgánico y su amplia distribución en una cantidad considerable de matrices biológicas, estos antimicrobianos actúan principalmente en los procesos finales de las síntesis de componentes conformacionales de la pared celular bacteriana, por lo que se los considera como bactericidas relativamente lentos (Hamon *et al.*, 2021).

#### **2.2.1.1. Farmacocinética y farmacodinamia**

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son bactericidas en cierta medida ya que exclusivamente ejercen efectos inhibitorios de componentes de la pared celular de algunas bacterias susceptibles únicamente en la fase exponencial de su crecimiento, también se debe considerar que su eficacia esta dependiendo del tiempo de uso y las dosis suministradas ya que la efectividad depende de la MIC y los mecanismos de resistencia de las bacterias, que puede llevar a situaciones poco convenientes como las consecuencias en la aparición de reacciones inflamatorias exacerbadas que podrían llevar a una endotoxemia (Hincapié, *et al.*, 2021).

Metabólicamente estos antibióticos se mantienen estables y suelen resistir a los procesos de degradación digestiva y metabólica a nivel del hígado, sus moléculas suelen mantener sus estructuras incluso hasta su eliminación mediante excreción por vía renal, por lo que es importante tomar en cuenta estas consideraciones clínicas en pacientes que presenten comorbilidad renal (Roca *et al.*, 2019).

#### **2.2.1.2. Efecto antimicrobiano**

La susceptibilidad de ciertos patógenos tanto Gram positivos como Gram negativos es la condición permisiva para discurrir en su efectividad, considerando que estos actúan de manera exclusiva sobre la síntesis de componentes estructurales de la pared celular bacteriana, no se puede orientar su administración en aquellos casos que son causados por microorganismos que carecen de pared celular, así como en aquellos que presenten un ensamblaje complejo de dicha estructura bacteriana, o a su vez, no es aconsejable incluirlos en terapias antimicrobianas de bacterias multirresistentes o productoras de enzimas hidrolizantes como las betalactamasas, carbapenemasas, etc. (Calles *et al.*, 2022).

#### **2.2.1.3. Efecto farmacológico**

Existe mucha similitud en el mecanismo de acción de los antibióticos clasificados como  $\beta$ -lactámicos, y la referencia bibliográfica menciona que actúan de dos maneras, una tiene relación con la restricción en la producción de componentes estructurales de la pared celular bacteriana, y la otra es que propicia la autodestrucción del agente bacteriano vinculado, estos mecanismos de acción anteceden el uno del otro, sin embargo, se debe estimar las diferencias individuales entre los Gram positivos y Gram negativos, ya que estas diferencias específicamente en la pared bacteriana provoca que los antibióticos  $\beta$ -lactámicos actúen de manera diferenciada, un claro ejemplo es la formación de complejos enzimáticos llamados penicillin binding protein “PBP” (proteínas ligadas a la penicilina) que provocan el cambio en la estructura de la misma y la muerte de la bacteria (Plumb, 2017)

## 2.2.2. Distribución de los antibióticos $\beta$ -lactámicos

### 2.2.2.1. Penicilinas

Se pueden dividir según su actividad antibacteriana en las siguientes clases:

- **Penicilinas naturales:** En esta agrupación se encuentran las G las cuales son le mayor representante de esta familia, las cuales han sido utilizadas históricamente para el tratamiento de infecciones de distintas índoles, las penicilinas G metabólicamente exhiben una duración de sus concentraciones plasmáticas media muy corta y requiere aplicaciones en intervalos de cada 4 horas, se les puede añadir moléculas procaínica o benzatina y algunas penicilinas V que son de administración oral (Rosales & Granja, 2017).
- **Penicilinas semi-sintéticas:** Farmacológicamente también son conocidas como aminopenicilinas, dentro de esta agrupación se destaca la de mayor uso cuya denominación es “Ampicilina” en ciertos enfoques terapéuticos este antibiótico es considerado como de amplio espectro, ya que puede inhibir el crecimiento tanto de Gram positivos como de Gram negativos, dentro de esta clasificación también se reconoce a la amoxicilina la cual ha sido usada ampliamente para el control y erradicación de bacterias causantes de neumonías ventajosamente, este antimicrobiano puede actuar sinérgicamente en conjunto con los antibióticos clasificados como macrolidos (Plumb, 2017).
- **Penicilinas tolerantes a las penicilinasas:** Estos antimicrobianos nacieron a partir de la identificación de la producción de las enzimas penicilinasas por parte de los microorganismos, uno de los mas claros ejemplos es la Meticilina la cual ha sido utilizada para controlar infecciones causadas por cocos nosocomiales resistentes a otras penicilinas de uso común, sin embargo, la producción otro tipo de enzimas hidrolizantes como las betalactamasas, carbapenemasas o metalcarbapenemasas, por parte del agente etiológico vinculado es un factor considerable que interviene en la disminución del efecto antibacteriano por parte de este grupo de medicamentos antibióticos (Plumb, 2017).

#### 2.2.2.2. Inhibidores de Betalactamasa

Con el descubrimiento de la capacidad que poseen ciertos microbios de producir sustancias antibacterianas como el caso del *Streptomyces clavulagerus* el responsable de producir y de haberse identificado al ácido clavulánico, se ubicó su utilidad y la capacidad de asociarse con algunos betalactámicos especialmente con la amoxicilina con quien presentó un alto grado de afinidad, gracias a su similitud en su estructura química permite a la molécula interactuar con la enzima betalactamasa secretada por ciertas bacterias la misma que le confiere resistencia contra los antibióticos, el ácido clavulánico es un inhibidor que se une covalentemente al sitio activo de un residuo de la betalactamasa. (Rosales & Granja, 2017).

Los componentes considerados como inhibidores de betalactamasas ha sido asociados con ciertos antibióticos  $\beta$ -lactámicos metabólicamente poseen una alta eliminación bilio-entérica y se plantea la posibilidad de que se pueda asociar con algunos antibióticos de nueva generación como el avibactam que es un inhibidor de betalactamasa que no es similar estructuralmente a los betalactámicos, el cual mejoraría efecto antibacteriano de algunas cefalosporinas (Calles *et al.*, 2022).

#### 2.2.2.3. Cefalosporinas

Clínicamente dentro de las opciones terapéuticas se podría inferir que las cefalosporinas con cada uno de los fármacos que conforman cada una de sus generaciones son la elección secundaria para el tratamiento de una infección bacteriana, en la actualidad se han categorizado en 4 generaciones y según se reporta es compartido el mecanismo de acción entre generaciones, la diferencia entre estas radica en su amplitud de espectro antibacteriano, y la reducción en las MIC conforme se trate con antibióticos de mas alta generación (Rosales & Granja, 2017).

- **Cefalosporinas de primera generación:** Los fármacos antibióticos que se encuentra en este grupo o categoría han sido utilizados por su inherente actividad contra cocos Grampositivos, considerando que contra Gramnegativos su espectro es nulo, en esta categoría se destaca la Cefazolína y Cefadroxil (Plumb, 2017).

- **Cefalosporinas de segunda generación:**

En esta clasificación son atribuidas ciertas diferencias que poseen los fármacos antibióticos, se asume que en su ensamble químico presentan adicionalmente un radical metoxi unido al anillo  $\beta$ -lactámico lo que les permite diferenciarse de la categoría anterior, estas diferencias les permiten ser en mayor medida resistentes a las enzimas que hidrolizan a los fármacos  $\beta$ -lactámicos por lo que alternativamente actúan con mayor eficiencia en ciertos casos de resistencia antibiótica a las penicilinas y cefalosporinas de primera incluyendo infecciones causadas por cocos G+, los agentes destacables de esta categoría son la cefuroxima, cefoxitina etc, (Plumb, 2017).

- **Cefalosporinas de tercera generación:** se reconocen como aminotiazólicos o también en cierta referencia bibliográfica como iminometoxicefalosporinas en relación a su nomenclatura química, su efecto antimicrobiano es mayor que el de las categorías que anteceden a esta, en esta clasificación se incluyen algunos antibióticos de administración PO, las más destacables son la cefixima, ceftibuteno, cefpodoxima, etc.

- **Cefalosporina de cuarta generación:** Al igual que los fármacos de la tercera generación estas poseen un espectro antimicrobiano más completo, lo que diferencia a los antibióticos incluidos en esta clasificación es su capacidad hidrofílica la cual aumenta la capacidad de difundirse a través de la pared celular bacteriana, permitiendo que la inhibición de su síntesis sea más rápida y eficiente que los fármacos de las categorías anteriores, por estas determinantes son muy utilizados en infecciones causadas por Gram- y en algunos productores de betalactamasas (Plumb, 2017).

#### **2.2.2.4. Monobactámicos**

Son betalactámicos de nomenclatura perteneciente al monociclitol, estos antimicrobianos han sido utilizados de manera ventajosa en aquellos que presentan algún tipo de sensibilidad histamínico dependiente a fármacos como las penicilinas y cefalosporinas, contraproducentemente no posee efecto antimicrobiano de cocos G-, orientando su utilidad solamente a bacterias G+ (Rodríguez *et al.*, 2022).

#### **2.2.2.5. Carbapenémicos**

A diferencia de los fármacos antes mencionados este tipo de antibióticos no poseen el anillo  $\beta$ -lactámico en su estructuración química, estos antibióticos se caracterizan por contener el anillo cabapenem, son poco utilizados pero se sabe que dentro del grupo de fármacos  $\beta$ -lactámicos los carbapenémicos poseen un mayor grado de resistir a la hidrólisis enzimática por parte de las bacterias y su espectro es tanto para G<sup>+</sup> como para G<sup>-</sup>, los agentes más destacables utilizados en medicina veterinaria y humana se encuentran el imipenem, meropenem, doripenem, ertapenem (Rojas *et al.*, 2021).

#### **2.3. Mecanismos de resistencias**

Ciertos microorganismos patógenos en función a su necesidad de sobrevivir han desarrollado la capacidad adaptativa en determinados escenarios adversos que generalmente no son compatibles con su desarrollo y expresión patogénica, de tal modo, se considera que la exposición repetitiva y de manera enlongada a los agentes antibióticos a provocado que se generen mecanismos de tolerancia a los componentes activos de los fármacos mencionados anteriormente.

Los principales mecanismos de resistencia son 4, y un agente patógeno bacteriano puede expresar uno o varios, se considera que el primero es el cambio en el sitio donde actúan los antibióticos, el segundo es mediante la expresión de enzimas hidrolizantes (Betalactamasas) y acetilantes, el tercero es mediante modificación de la permeabilidad de la pared celular bacteriana y por ultimo mediante la expulsión del antibiótico con participación de bombas de E-flujo, cada uno de estos componentes pueden aparecer de manera nativa entre generaciones de microorganismos resistentes u obtenida mediante el intercambio de información genética (genes de resistencia) entre microorganismos emparentados o de especies diferentes.

Inclusivamente ciertas enterobacterias han desarrollado mecanismos que les permiten desvincularse de la acción de un antibiótico mediante la funcionalidad activa mediada por determinados genes un claro ejemplo son los genes *oqxAB* y *qepA* que les confiere resistencia a los aminoglucósidos (Cheng *et al.*, 2020).

#### **2.4. Producción de betalactamasas**

La producción de enzimas hidrolizantes es una característica inherente de ciertos microorganismos, un de ellos son las enterobacterias o bacilos Gram-negativos poseen la capacidad de resistir a la acción de los betalactámico mediante la producción de betalactamasas, los niveles de resistencia dependen de la cantidad de betalactamasa producida por parte de la enterobacteria (Castanheira *et al.*, 2021).

Variaciones o mutaciones en componentes o determinantes genéticos de ciertas bacterias, como en los microorganismos entéricos, pueden inferir en la expresión de que la bacteria causante de alguna patología inicie con la producción de betalactamasas, estos cambios pueden ser de origen cromosómico o extracromosómico (Sawa *et al.*, 2020)

Las mutaciones cromosómicas: se debe a modificaciones en los genes de la bacteria, los cuales controlan las funciones y estructuras sobre las cuales actúan los antibióticos generando alteraciones en la sensibilidad de la bacteria, primordialmente ocurre una modificación en la secuencia de bases y componentes nucleicos, los cuales serán reordenados y haciendo a las bacterias expresar resistencia antibióticos (Sawa *et al.*, 2020).

Los elementos extracromosómicos de una microorganismo patógeno son considerados como transportadores de información, en estos elementos hallamos a los plásmidos y los trasposones, que poseen la habilidad de trasladar información genética, que será el punto de partida para su codificación y ensamblado, pudiendo ocurrir en bacterias de igual o diferente género y especie, este proceso microbiológico es definido mediante la participación de tres eventos consecutivos y determinantes; Primero ocurren los procesos de conjugación de un plásmido que contiene información genética acaparada, la misma que será transferida a otra bacteria, en donde ocurre el segundo paso que es la transcripción y transformación para su posterior reajuste en la bacteria receptora, estos procesos biológicos llevan al tercer y último punto que es en donde el ADN donador se incorpora al ADN del microbio receptor, este proceso permite que se desencadenen funciones de expresión de los nuevos genes (Sawa *et al.*, 2020).

#### **2.4.1. Categorización de las betalactamasas**

Determinados microorganismos producen ciertas enzimas con mecanismos hidrolizantes, un ejemplo son las betalactamasas, las cuales son procedentes de microorganismos con patrones adaptativos las cuales les han permitido excluirse del efecto de los betalactámicos y su capacidad inhibitoria de componentes de la pared celular, los principales microorganismos productores de estas enzimas son las enterobacterias o bacilos, lo que se han estudiado y se ha reportado el hallazgo de cuatro patotipos de betalactamasas;

- BLEE
- Grupo 2 ber, 2be y 2de
- SHV, OXA, CTX-M y TEM
- Grupo 2 br.
- FOX, MIR, LAT, CMY
- Carbapenemasas
- Grupo 3, 2f y 2df

(Bush & Bradford , 2020)

#### **2.4.2. Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)**

Las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) son un determinado tipo de enzimas producidas por patógenos entéricos Gram negativos, su determinación se ha asociado a la capacidad de estas sustancias de hidrolizar y neutralizar el efecto de antibióticos como las penicilinas, aminopenicilinas, cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación (exceptuando a la cefoxitina), además de monobactámicos, este tipo de sustancia no interfiere con el mecanismo de acción de los carbapenémicos, ni de los inhibidores de las betalactamasas como el ácido clavulánico, el tazobactam y sulbactam. (Taniguchi *et al.*, 2021).

La manera en que ciertas enterobacterias producen BLEE se debe principalmente a que han recibido plasmados y genes mediante transferencia directa de microorganismos productores o a partir de cepas nodrizas resistentes, la recepción en casi todos los casos ah sido a partir de elementos de movilidad de la bacteria,



estas BLEE se clasifican de distintos modos, pero de manera estandarizada se pueden clasificar en A, B, C y D de acuerdo con Ambler, Bush y Jacoby en dependencia del grupo las enzimas producidas cuando la bacteria es expuesta a un sustrato farmacológico que generalmente son betalactámicos (Goulart & Mellata, 2022).

**Tabla 3.**

*Clasificación de las betalactamasas de espectro extendido.*

<b>Ambler</b>	<b>Bush y Jacoby</b>	<b>Antibiótico</b>	<b>Inhibición por A. clavulánico</b>	<b>Clase</b>
<b>A</b>	2be	Cefalosporinas de amplio espectro, monobactámicos	+	PER, SHV, VEB, CTX-M, TEM
<b>D</b>	2de	Cefalosporinas de amplio espectro,	+/-	OXA
<b>A</b>	2ber	Cefalosporinas de amplio espectro, monobactámicos	-	Complejo mutante TEM: (CMT)

Fuente: Matta *et al.* (2022)

### 2.5. Pruebas fenotípicas para la detección

La observación y el registro del comportamiento de la bacteria sometida a pruebas de susceptibilidad con la utilización de antibióticos betalactámicos puede definir si la bacteria es productora de BLEE, esto se realiza con la medición de sus resistencias a las cefalosporinas y monobactámicos mediante la técnica de difusión de disco a una concentración definida, (Matta *et al.*, 2022).

En los manuales M100 edición 33 y VET 01S edición 6 del Clinical & Laboratory Standards Institute CLSI (2023), recomiendan que para definir si una enterobacteria es productora de BLEE se debe realizar pruebas de susceptibilidad optando con la aplicabilidad de la técnica de Kirby-Bauer mediante difusión de discos de antibióticos de Cefpodoxima 10 µg, Ceftazidima 30 µg, Aztreonam 30 µg, Cefotaxima 30 µg, Ceftriaxona 30 µg, en donde se medirá el área de inhibición del

crecimiento efecto de los antibióticos y serán comparado con los puntos de cortes establecidos en los mismos reportes (CLSI, 2022).

También recomienda usar pruebas de crecimiento mediante las pruebas de control que básicamente se fundamentan en utilizar medios solidos que contengan una concentración de un antibiótico betalactámico de 1mg/L de medio de cultivo preparado en donde serán sembradas las cepas en estudio (CLSI, 2022).

**Tabla 4.**

*Puntos de corte para los antibióticos usados para determinación de BLEE.*

<b>Antibiótico</b>	<b>Medida del halo de inhibición (mm)</b>
cefepodoxima	$\leq 17$ mm
ceftazidima	$\leq 22$ mm
aztreonam	$\leq 27$ mm
cefotaxima	$\leq 27$ mm
ceftriaxona	$\leq 25$ mm

Fuente: CLSI, (2022).

Los criterios de identificación fenotípica se basan en observar el efecto sinérgico es con la interacción de Ceftazidima o Cefotaxima solas y en combinación con el ácido clavulánico, al observar un aumento en el diámetro del halo de  $\geq 5$  mm, se atribuye la presencia de la producción de BLEE, además se debe observar la interacción sinérgica de los antibióticos en estudio con un disco de amoxicilina más ácido clavulánico, según en el documento M100 (CLSI, 2022).

## CAPÍTULO III

### 3. MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1. Ubicación y características de la investigación

- **Localización del experimento**

---

<b>Provincia</b>	Bolívar
<b>Cantón</b>	Guaranda
<b>Parroquia</b>	Gabriel Ignacio Veintimilla
<b>Sector</b>	Laguacoto, Vía Guaranda – San Simón Km 1 ½

---

- **Situación geográfica y edafoclimática**

---

<b>GEOREFERENCIA Y SITUACIÓN CLIMÁTICA</b>	
<b>Altitud</b>	2607.00 metros
<b>Latitud</b>	1°36'22"S
<b>Longitud</b>	79°00'02" W
<b>Temp máxima</b>	19.5 °C
<b>Temp mínima</b>	10.0 °C
<b>Temp media</b>	15.0 °C
<b>Precipitación media anual</b>	1622 mm <sup>3</sup>
<b>Humedad relativa (%)</b>	71%

---

Fuente: Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (2021).

- **Zona de vida**

Guaranda se sistematiza y clasifica como una zona de formación Bosque Húmedo Montano Bajo de acuerdo a su patrón altitudinal según el Dr. L. Holdridge y su clasificación (Holdridge, 1971).

## **3.2. Metodología**

### **3.2.1. Material Experimental.**

- Aislados de *Klebsiella* spp.
- Aislados de *Escherichia coli*
- Medio de cultivo Müeller-Hinton
- Medio de cultivo Eosine Methilene Blue
- Ampolla de Ceftriaxona (Vitalis, Arg)
- Cefpodoxima (OXOID, Lot. 3304707, RU).
- Ceftazidima (BDBBL, Lot. 3304707, USA).
- Aztreonam (BDBBL, Lot. 2244457, USA)
- Cefotaxima (BDBBL, Lot. 2090467, USA)
- Ceftriaxona (BDBBL, Lot. 2277466, USA)
- Amoxicilina más ácido clavulánico (OXOID, Lot.3595342, R U)
- Ceftazidima más ácido clavulánico (BDBBL, Lot. 210433, USA)
- Cefotaxime más ácido clavulánico (BDBBL, Lot. 2210415, USA)
- Antibiótico de Cefoxitin (OXOID, Lot. 3458723, Reino Unido)

### **3.2.2. Factores en estudio**

#### **Factor A**

- a1: Aislados de *Escherichia coli*
- a2: Aislados de *Klebsiella* spp.

#### **Factor B**

- b0: Disco de inhibición de Amoxicilina más ácido clavulánico
- b1: Disco de inhibición de Cefpodoxima 10 µg
- b2 Disco de inhibición de Ceftazidima 30 µg

- b3 Disco de inhibición de Aztreonam 30 µg
- b4 Disco de inhibición de Cefotaxima 30 µg
- b5 Disco de inhibición de Ceftriaxona 30 µg

### 3.2.3. Tratamientos

**Tabla 5.**

*Descripción del aplicativo de los tratamientos*

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN
1	Aislados de <i>Escherichia coli</i> + Disco de inhibición de Amoxicilina más ácido clavulánico
2	Aislados de <i>Escherichia coli</i> + Disco de inhibición de Cefpodoxima 10 µg
3	Aislados de <i>Escherichia coli</i> + Disco de inhibición de Ceftazidima 30 µg
4	Aislados de <i>Escherichia coli</i> + Disco de inhibición de Aztreonam 30 µg
5	Aislados de <i>Escherichia coli</i> + Disco de inhibición de Cefotaxima 30 µg
6	Aislados de <i>Escherichia coli</i> + Disco de inhibición de Ceftriaxona 30 µg
7	Aislados de <i>Klebsiella</i> spp., + Disco de inhibición de Amoxicilina más ácido clavulánico
8	Aislados de <i>Klebsiella</i> spp., + Disco de inhibición de Cefpodoxima 10 µg
9	Aislados de <i>Klebsiella</i> spp., + Disco de inhibición de Ceftazidima 30 µg
10	Aislados de <i>Klebsiella</i> spp., + Disco de inhibición de Aztreonam 30 µg
11	Aislados de <i>Klebsiella</i> spp., + Disco de inhibición de Cefotaxima 30 µg
12	Aislados de <i>Klebsiella</i> spp., + Disco de inhibición de Ceftriaxona 30 µg

Experimental: Rogel (2023).

### 3.2.4. Tipo de diseño experimental o estadístico.

El desarrollo estadístico se llevó a cabo aplicando el siguiente diseño experimental;

- DBCA

Patrón matemático;  $Y_{IJ} = u + T_i + b_j + E_{ij}$

**Donde:**

$Y_{IJ}$  = Deducción sobre el parámetro a medir (variable)

$u$  = intervalo, efecto del promedio

$T_i$  = intervalo, resultado del tratamiento I

$B_j$  = intervalo, resultado de la repetición J

$E_{ij}$  = Rubrica al azar del error experimental de la  $Y_{i,j}$

- Duncan con 5%, para estimar la comparación de los promedios

**Tabla 6.**

*Particularidades numéricas de la investigación*

<b>Tratamientos Clínicos</b>	12
<b>Número de Rep</b>	12
<b>Proporción de la unidad experimental</b>	100 gr
<b>Cepas bacterianas totales</b>	12
<b>Totalidad de ensayos</b>	144

**Tabla 7.**

*Fuentes de estudio del ADEVA*

<b>Fuentes de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>
<b>Total</b>	35
<b>Tratamientos</b>	5
<b>Bloques</b>	5
<b>Error del diseño</b>	25

### 3.2.5. Manejo del experimento

- **Revitalización de aislados bacterianos**

De la batería de microorganismos que se encuentran bajo criopreservación en el Laboratorio General de la Facultad en el área de Microbiología, se consideraron los crioviales de los géneros bacterianos que fueron seleccionados para la experimentación, constatando que estos microorganismos ya poseen un historial de resistencia a los antimicrobianos de experimentos desarrollados, el procedimiento inicia con el acondicionamiento de la temperatura del vial, considerando que esta debe llegar de los 2° C hasta la temperatura ambiente en primeras instancias por un tiempo de 60 minutos lo cual será necesario para luego activar la vías nutricionales de la bacteria mediante incubación durante 60 minutos.

Una vez que se cubrió el proceso del ajuste de la temperatura se procedió a tomar una proporción de mil microlitros ( $\mu\text{l}$ ) del vial que contiene la bacteria, esta microcuota se inoculó en tubos de tapa rosca de 10 mililitros (mL) que contienen caldo de cultivo bacteriológico se sellaron con parafilm y se incubó a 37° C por 24 horas.

Los medios de cultivo considerados para las siembras iniciales en la reanimación fueron el medio MacConkey y el medio EMB (Eosin Methylene Blue), en los cuales se colocó 1000  $\mu\text{L}$  del contenido del tubo previamente incubado con la cepa bacteriana en experimentación, se selló con parafilm y se introdujo a incubación por un tiempo de 24 a 48 horas con una regulación térmica de 37 grados centígrados.

- **Identificación bioquímica**

Los componentes de identificación se fundamentaron en las siguientes pruebas;

- **Indol:** Establece si el microorganismo conserva la producción enzimática de la Triptofanasa, que es encargada de hidrolizar el triptófano en indol y alanina, se consigue manifestar estas bioenzimas con el reactivo de Kovac's en el cultivo líquido.

- **Rojo metilo:** Con esta prueba se revela la fermentación ácido mixta mediante el acaparamiento de ácidos internamente en el cultivo, evaluándose mediante la medición con un guía de pH cuya diferenciación en el cambio de

coloración indica si la bacteria genera ácidos a partir de su metabolismo fermentativo.

- **Voges proskauer:** Pone en manifiesto si el microorganismo ejecuta la fermentación butanodiólica, en el procedimiento se usó alfa naftol 6% e hidróxido de potasio (KOH) que permitieron observar la caracterización de la acetoína como un precursor de butanodiol.
- **Citrato:** se utilizó para descubrir los microorganismos que poseen la facultad de valerse del citrato como única fuente calórica para su desarrollo, en su aplicación se requiere el medio Citrato de Simon's.

Los perfiles Triple Sugar Iron (TSI) aplicados con el fin de caracterizar a los microbios entéricos G- este ensayo se fundamenta en observar los patrones fermentivos;

- Fermentación de Sacarosa
- Fermentación de lactosa
- Fermentación de dextrosa
- Producción de ácido sulfhídrico
- Producción de gas
- **Antibiogramas**

Se realizó utilizando los lineamientos del método de Kirby-Bauer, en medio estable solido con una densidad de bacterias  $1 \times 10^8$  UFC/mL (0.5 McFarland) esta suspensión de bacterias se sembró con la ayuda de un hisopo estéril de manera continua en el medio de crecimiento bacteriano, el cual tras inocularse se colocaron los discos de antibióticos según lo detalla el CLSI, con una separación mínima de 2 cm entre disco para su posterior cierre y sellado e incubación a 37 grados centígrados.

Las pruebas de antibiograma permitieron identificar patrones de producción de betalactamasa de espectro extendido, para ello se contempló las siguientes pruebas;

- Pruebas de susceptibilidad



- Pruebas de crecimiento
- Pruebas del efecto sinérgico
- Pruebas del aumento del halo de inhibición

Utilizando los siguientes discos de antibióticos con su respectiva concentración; Ceftazidima 30 µg, Cefpodoxima 10 µg Aztreonam 30 µg, Ceftriaxona 30 µg, Cefotaxima 30 µg, adicionalmente con discos de Amoxicilina más ácido clavulánico, Cefotaxima más ácido clavulánico y Ceftazidima más ácido clavulánico.

### 3.2.6. Métodos de evaluación y datos a tomar

- **Perfiles de identificación:** Este parámetro es de característica independiente, para su efecto se tomaron en cuenta los resultados de las pruebas de Indol, Rojo Metilo, Voges Proskauer, y utilización del Citrato y TSI (Triple Sugar Iron) para la exhibición de sus patrones nutricionales y metabólicos, además de sus características fermentativas, en este caso para *Escherichia coli* (I+; RM+; VP-; C-) (TSI: Glu+; Sac-Lac+; Gas+; H<sub>2</sub>S-) y *Klebsiella* spp. (I-/++; RM-variable; VP+; C+) (TSI: Glu+; Sac-Lac+; Gas variable; H<sub>2</sub>S-)
- **Sensibilidad y resistencia:** Es una herramienta facultativa que tiene ciertos microorganismos de soportar (resistencia) o reaccionar (sensibilidad) al mecanismo de acción de un fármaco en cuestión a una concentración determinada, es una variable de tipo independiente y se mide en base a las medidas de las zonas de inhibición del crecimiento en donde fueron comparados con los puntos de corte establecido en por el (CLSI, 2023) en el documento M100.
- **Producción de BLEE:** Es un método de evaluación con características independiente, para su efecto se tomaron en cuenta varios criterios de análisis, iniciando con la observación del efecto sinérgico de los antibióticos en estudio (Cefpodoxima 10 µg, Ceftazidima 30 µg, Aztreonam 30 µg, Cefotaxima 30 µg, Ceftriaxona 30 µg), con el disco de amoxicilina más ácido clavulánico, adicionalmente se considerara la prueba de crecimiento en medió de cultivo solido al cual durante su formulación se le añadió ceftriaxona a razón de 1 mg/L, continuando el registro y medición del aumento del área de inhibición, el cual fue

propiciado por el ácido clavulánico que provoca la inhibición de las enzimas Betalactamasas, para su efecto se utilizaron los discos de; Ceftazidima más ácido clavulánico, Cefotaxima más ácido clavulánico, considerando que las recomendaciones del CLSI (2023) mencionan que, un aumento de  $\geq 5$  mm en el diámetro de la zona para cualquier agente antimicrobiano probado en combinación con clavulanato frente al diámetro de la zona del agente cuando se prueba solo, es un indicativo de la producción de betalactamasa de espectro extendido (BLEE).

- **Estimación de la prevalencia de las BLEE:** La ocurrencia de *E. coli* y *Klebsiella spp* productoras de BLEE previamente aisladas de muestras clínicas de leche positiva a mastitis bovina y mediante la obtención de datos de las medidas de los halos de inhibición de la interacción con Cefpodoxima 10  $\mu$ g, Ceftazidima 30  $\mu$ g, Aztreonam 30  $\mu$ g, Cefotaxima 30  $\mu$ g, Ceftriaxona 30  $\mu$ g y en pruebas de sinergia con Amoxicilina más ácido clavulánico se determinó mediante el cálculo de la tasa de prevalencia (TP). Este indicó el número de aislados que producen BLEE existentes en el número de aislados totales en estudio, su desarrollo se llevó a cabo mediante la siguiente ecuación donde se determinó el resultado en porcentaje (Cuenca *et al.*, 2021).

$$TP = \frac{\text{Total de casos en una población y en un momento dado}}{\text{Total de la población en ese lugar y momento dado}} \times 100$$

### 3.2.7. Análisis de datos

Las medidas de las zonas de inhibición resultantes de la actividad antimicrobiana se tabularon y analizaron estadísticamente mediante el SAS 9.4 para observar el efecto de los betalactámicos y monobactámicos sobre las cepas bajo experimentación.

## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

##### 4.1.1. Perfiles de identificación de las bacterias en estudio causantes de mastitis bovina

**Tabla 8.**

*Perfiles de identificación de las bacterias en estudio*

Género	No	Identificación IMViC				Identificación TSI			
		I	RM	VP	Cit	Glu	Sac-Lac	Gas	H <sub>2</sub> S
<i>E. coli</i>	1	+	+	-	-	+	+	+	-
	2	+	+	-	-	+	+	+	-
	3	+	+	-	-	+	+	+	-
	4	+	+	-	-	+	+	+	-
	5	+	+	-	-	+	+	+	-
	6	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>Klebsiella</i> spp.	1	+	-	+	+	+	+	+	-
	2	+	-	+	+	+	+	+	-
	3	+	-	+	+	+	+	+	-
	4	+	-	+	+	+	+	+	-
	5	+	-	+	+	+	+	+	-
	6	+	-	+	+	+	+	+	-

*Nota.* I: indol, RM; rojo metilo, VP; voges proskauer, Cit; citrato, Glu; glucosa, Sac-Lac; Sacarosa y Lactosa, H<sub>2</sub>S; ácido sulfhídrico.

Como resultado de las pruebas de identificación bioquímica aplicadas a cada una de las cepas seleccionadas del conjunto de microorganismos que se encuentra en la sección de microbiología del laboratorio general de la facultad, se logró evidenciar que la totalidad de los microorganismos seleccionados para el estudio, pertenecían a los géneros *Klebsiella* spp y *E. coli* mediante aplicación del consenso establecido en los perfiles metabólicos IMViC y TSI.

Las cepas reidentificadas usada en la experimentación fueron asiladas e identificadas en el estudio de pregrado de Mazón & Mazón (2022), de vacas con casos de mastitis clínica y subclínica en el noroccidente de la provincia de Pichincha. Recalcando que las bacterias *Klebsiella* y *E. coli* y mostraron los mismos perfiles de identificación reportados por los autores citados.

#### 4.1.2. Susceptibilidad y resistencia de los patógenos

##### 4.1.2.1. ADEVA del efecto de los betalactámicos en estudio versus *Escherichia coli* obtenida de mastitis bovina

**Tabla 9.**

*ADEVA del impacto de los betalactámicos sobre cepas de E. coli.*

<b>F. V</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>V-F</b>	<b>Pr</b>
<b>Tratamientos</b>	5	522.56	104.51	74.41	<.0001**
<b>Repeticiones</b>	5	89.89	17.978	12.80	<.0001**
<b>Error</b>	25	35.11	1.404	Coeficiente de Variación: 5.41%	
<b>Total</b>	35	647.56			

Por medio del ensayo estadístico del ANOVA, en los valores calculados de la probabilidad de F, corroboramos la presencia de diferencias estadísticas altamente significativas, evidenciando que los betalactámicos utilizados en el antibiograma inhibieron de manera diferenciada a cada una de las *E. coli*, considerando que el estadístico determinó un CV del 5.41% lo que asigna fiabilidad y veracidad a los resultados obtenidos.

**Tabla 10.**

*Promedios de las zonas de inhibición de los betalactámicos frente a E. coli.*

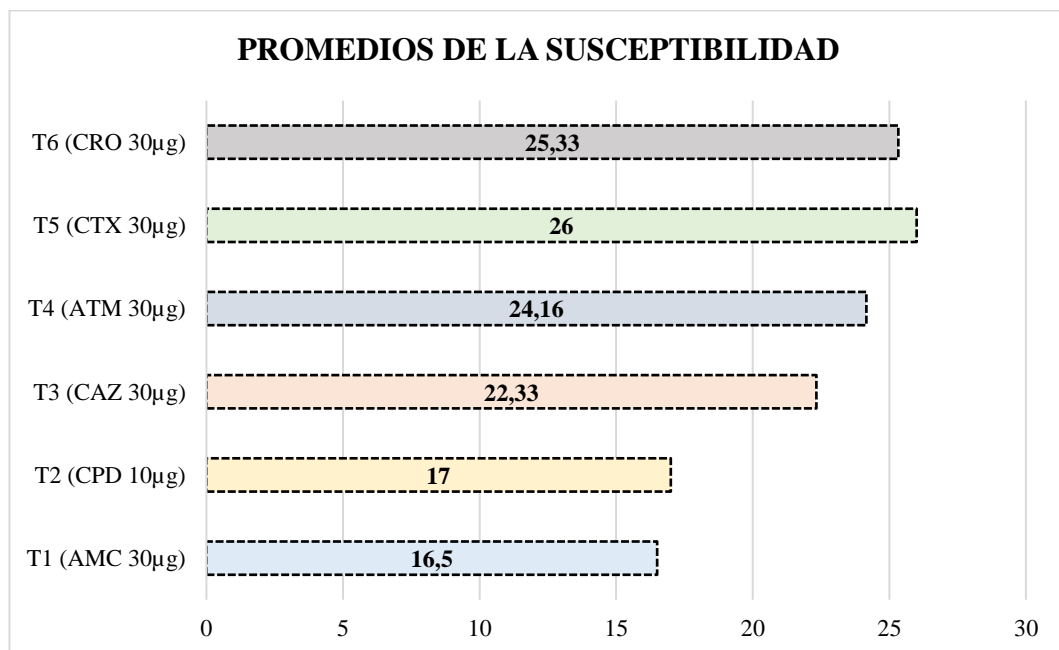
<b>TRATAMIENTOS</b>	<b>PROMEDIO</b>	<b>AGRUPACIÓN</b>
5 (CTX 30µg)	26.00	A
6 (CRO 30µg)	25.33	A B
4 (ATM 30µg)	24.16	B
3 (CAZ 30µg)	22.33	C
2 (CPD 10µg)	17.00	D
1 (AMC 30µg)	16.50	D

*Nota.* Medias cubiertas por la misma letra no son significativamente diferentes AMC: amoxicilina + ácido clavulánico; CPD: cefpodoxima; CAZ: ceftazidima; ATM: aztreonam; CTX: cefotaxima; CRO: ceftriaxona.

El hallazgo mediante la prueba de Duncan al 5% sobre las medidas de las regiones inhibitorias, exhibió que el tratamiento 5 comprendido por el efecto de cefotaxima de 30µg quien reportó 26 mm de diámetro en la región inhibitoria, categorizándose como el mayor promedio numérico identificado, sin embargo se recalca que según esta prueba dicho tratamiento es estadísticamente semejante al tratamiento 6 el mismo que obtuvo un promedio de 25.33 mm de diámetro en la región inhibitoria determinados por ceftriaxona, a su vez dicho tratamiento exhibió igualdad estadística con el tratamiento 4, quien ostentó una medida de 24.16 mm en la región inhibitoria determinado por efecto del aztreonam de 30µg. Al considerar el valor de 22.33 mm de zona de inhibición determinado por ceftazidima de 30µg podemos inferir que el tratamiento 3 ostentó diferencias estadísticas en comparación a los antes mencionados, adicionalmente los tratamientos que expresaron los menores promedios en las regiones inhibitorias fueron el tratamiento 2 y el tratamiento 1 quienes obtuvieron una medida de 17 y 16.50 mm individualmente, los cuales se categorizaron según Duncan como valores paralelos.

**Figura 2.**

*Promedios de las regiones inhibitorias de los betalactámicos usados con respecto a E. coli obtenidas de mastitis bovina.*



En el reporte investigativo de Muleme *et al.* (2023) quienes caracterizaron fenotípicamente la producción de BLEE por parte de *E. coli* aisladas de humanos, animales y del medio ambiente, de un total de 100 bacterias obtenidas, 9 cepas se obtuvieron de vacas en lactancia, la cuales fueron resistentes a las cefalosporinas de tercera generación manifestando discrepancias estadísticas significativas en los antibiogramas ya que lograron medidas por debajo de los puntos de corte establecidos por el CLSI para ser categorizadas como sensibles. En relación a lo obtenido en nuestros ensayos se asumen como datos muy similares ya que mostraron diferentes medidas en los halos de inhibición en el antibiograma.

#### 4.1.2.1.1. Categorización interpretativa de la susceptibilidad de *Escherichia coli* expuesta a los betalactámicos investigados

**Tabla 11.**

*Medidas de los criterios categóricos de los antibióticos usados en las pruebas de susceptibilidad de E. coli*

<b>Amoxicilina más ácido clavulánico (AMC 30µg)</b>			
<b>Criterio categórico</b>	<b>Sensible</b>	<b>Intermediamente R.</b>	<b>Resistente</b>
EUCAST (AMC 30µg)	≥ 15	-	≤ 14
CLSI	≥ 18	17-14	≤ 13
<b>Cefopodoxima (CPD 10µg)</b>			
<b>Criterio categórico</b>	<b>Sensible</b>	<b>Intermediamente R.</b>	<b>Resistente</b>
CLSI	≥ 18	-	≤ 17
<b>Ceftazidime (CAZ 30µg)</b>			
<b>Criterio categórico</b>	<b>Sensible</b>	<b>Intermediamente R.</b>	<b>Resistente</b>
CLSI	≥ 23	-	≤ 22
<b>Aztreonam (ATM 30µg)</b>			
<b>Criterio categórico</b>	<b>Sensible</b>	<b>Intermediamente R.</b>	<b>Resistente</b>
CLSI	≥ 28	-	≤ 27
<b>Cefotaxima (CTX 30µg)</b>			
<b>Criterio categórico</b>	<b>Sensible</b>	<b>Intermediamente R.</b>	<b>Resistente</b>
CLSI	≥ 28	-	≤ 27
<b>Ceftriaxona (CRO 30µg)</b>			
<b>Criterio categórico</b>	<b>Sensible</b>	<b>Intermediamente R.</b>	<b>Resistente</b>
CLSI	≥ 26	-	≤ 25

**Tabla 12.***Resultados de las pruebas de susceptibilidad de E. coli*

<i>Escherichia coli</i>	Cóficación	Amoxicilina + ácido clavulánico		Cefpodoxima		Ceftazidina		Aztreonam		Cefotaxima		Ceftriaxona	
		30µg	Criterio	10 µg	Criterio	30 µg	Criterio	30 µg	Criterio	30 µg	Criterio	30µg	Criterio
1	AR001AI	18	S	20	S	24	S	28	S	28	S	26	S
2	AR013PI	17	I	17	R	22	R	23	R	24	R	24	R
3	D002PI	17	I	17	R	22	R	23	R	26	R	25	R
4	D003PI	15	I	13	R	22	R	21	R	24	R	25	R
5	EA006PI	14	I	15	R	21	R	22	R	26	R	25	R
6	AR004PD	18	S	20	S	23	S	28	S	28	S	27	S

*Nota.* S; sensible, R: resistente, I: intermedicamente resistente.

**Tabla 13.***Índice de susceptibilidad de E. coli con respecto los betalactámicos estudiados*

<b>Amoxicilina más ácido clavulánico (AMC 30µg)</b>			
<b>Criterio categórico</b>	<b>Sensible</b>	<b>Intermediamente R.</b>	<b>Resistente</b>
EUCAST	83.33	-	16.67
CLSI	33.34	66.68	-
<b>Cefpodoxima (CPD 30µg)</b>			
<b>Criterio categórico</b>	<b>Sensible</b>	<b>Intermediamente R.</b>	<b>Resistente</b>
CLSI	33.34	-	66.67
<b>Ceftazidima (CAZ 30µg)</b>			
<b>Criterio categórico</b>	<b>Sensible</b>	<b>Intermediamente R.</b>	<b>Resistente</b>
CLSI	33.33	-	66.67
<b>Aztreonam (ATM 30 µg)</b>			
<b>Criterio categórico</b>	<b>Sensible</b>	<b>Intermediamente R.</b>	<b>Resistente</b>
CLSI	33.33	-	66.67
<b>Cefotaxima (CTX 30 µg)</b>			
<b>Criterio categórico</b>	<b>Sensible</b>	<b>Intermediamente R.</b>	<b>Resistente</b>
CLSI	33.33	-	66.67
<b>Ceftriaxona (CRO 30 µg)</b>			
<b>Criterio categórico</b>	<b>Sensible</b>	<b>Intermediamente R.</b>	<b>Resistente</b>
CLSI	33.33	-	66.67

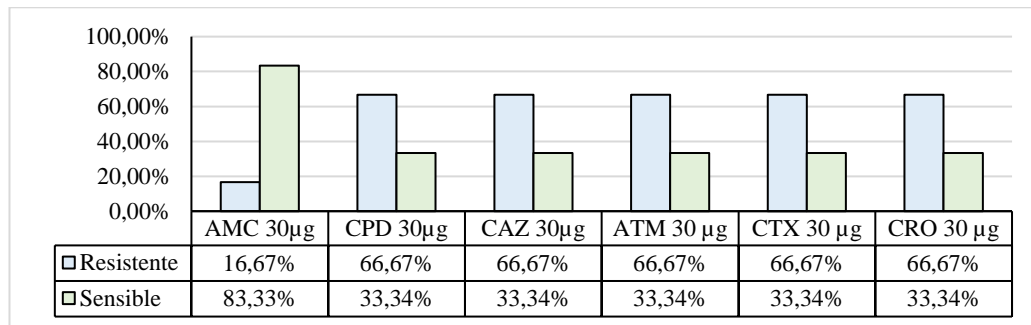
Las *Escherichia coli* presentaron distintos niveles de susceptibilidad en cada uno de los betalactámicos utilizados, evidenciando que al ser expuestos a amoxicilina más ácido clavulánico de 30 µg (AMC 30µg) el 83.33% de las cepas investigadas fueron sensibles y el 16.67% se manifestaron como resistentes de acuerdo a la guía del EUCAS (2023), mientras que referenciándose con la guía del documento M100 del CLSI (2023), se observó un 33.34% de sensibilidad y un 66.68% de resistencias intermedia.

Adicionalmente, se observó que en todas las cefalosporinas de tercera generación utilizadas para la caracterización fenotípica de la producción de BLEE, el 33.34 % de las *E. coli* se manifestaron como sensibles mientras que el 66.67% fueron resistentes a la cefpodoxima de 10µg (CPD 10µg), ceftazidima de 30µg (CAZ 30µg), cefotaxima de 30µg (CTX 30µg) y ceftriaxona de 30µg (CRO 30µg) equitativamente, determinándose los mismos niveles de sensibilidad y resistencia con el Aztreonam de 30µg (ATM 30µg), siendo este el único monobactámico utilizado en las pruebas de susceptibilidad.



**Figura 3.**

*Índice de susceptibilidad antimicrobiana de E. coli con respecto a los betalactámicos estudiados.*



En el reporte investigativo de Gelalcha *et al.* (2022) sobre la prevalencia de *Escherichia coli* productora de BLEE y su resistencia a los antimicrobianos en granjas lecheras, demostró que de un total de 14 *Escherichia coli* obtenidas de leche del tanque de recolección, tan solo 5 (35.7%) fueron resistentes a la cefotaxima (CTX), considerando que en el estudio genómico exhibieron genes que al expresarse les confiere resistencia a la cefotaxima y ceftiofur, este tipo de bacterias pueden ser altamente trasmisibles a los humanos directamente o indirectamente a través de los productos lácteos no procesados.

Por otra parte Widodo *et al.* (2023) quienes investigaron las características de resistencia a los antimicrobianos y la producción de BLEE por parte de *E. coli* en varias granjas lecheras de Indonesia, lograron determinar que de un total de 124 bacterias 87 se caracterizaron como *E. coli*, las mismas que fueron obtenidas de leche de vaca, en su reporte identificaron que 9 patógenos manifestaron resistencia fenotípica, favorablemente al estudiar de manera molecular a estos microbios reconfirmaron que solo el 22.22% (n=2) producían BLEE, las cuales mostraron tolerancia al aztreonam (ATM 30µg), y a las cefalosporinas de tercera generación, los investigadores resaltaron que este tipo *E. coli* pueden ser una amenaza para la salud pública.

En relación a lo obtenido en nuestros ensayos, podemos discutir que son datos cuya variabilidad esta sujeta al lugar de producción, por lo cual concordamos que son un amenaza potencial para la salud pública.

#### 4.1.2.2. ADEVA del efecto de los betalactámicos en estudio versus *Klebsiella* spp., obtenidas de mastitis bovina

**Tabla 14.**

*ADEVA del impacto de los betalactámicos en cepas de Klebsiella spp.*

<b>F. V</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>VF</b>	<b>PT</b>
<b>Tratamientos</b>	5	347.9166667	69.58333333	15.14	<.0001**
<b>Repeticiones</b>	5	63.9166667	12.78333333	2.78	0.0394*
<b>Error</b>	25	114.9166667	4.5966667	Coeficiente de Variación: 10.95%	
<b>Total</b>	35	526.7500000			

Por medio del ensayo estadístico del ANOVA con los valores calculados de la probabilidad de F, corroboramos la presencia de diferencias estadísticas altamente significativas, evidenciando que los betalactámicos utilizados en el antibiograma inhibieron de manera diferenciada a cada una de las *Klebsiella*, considerando que el estadístico determinó un CV del 10.95% lo que asigna fiabilidad y veracidad a los resultados obtenidos.

**Tabla 15.**

*Promedios de las zonas de inhibición de los betalactámicos frente a Klebsiella spp., obtenida de mastitis bovina.*

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>PROMEDIO</b>	<b>AGRUPACIÓN</b>
5 (CTX 30µg)	24.50	A
4 (ATM 30µg)	22.33	A
3 (CAZ 30µg)	19.67	B
6 (CRO 30µg)	19.00	B
1 (AMC 30µg)	16.33	C
2 (CPD 10µg)	15.67	C

*Nota.* Medias cubiertas por la misma letra no son significativamente diferentes AMC: amoxicilina + ácido clavulánico; CPD: cefpodoxima; CAZ: ceftazidima; ATM: aztreonam; CTX: cefotaxima; CRO: ceftriaxona.

El hallazgo mediante la prueba de Duncan al 5% sobre las medidas de las regiones inhibitorias, exhibió que el tratamiento 5 comprendido por el efecto de cefotaxima de 30µg reportó 24.50 mm de diámetro en la región inhibitoria, categorizándose

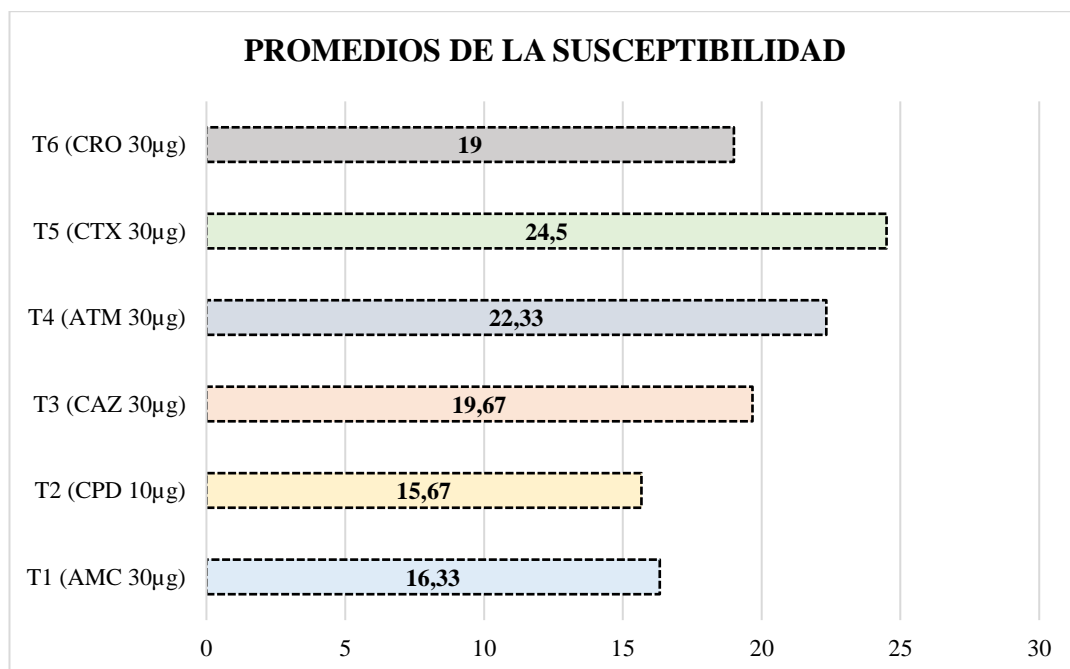
como el mayor promedio numérico identificado, sin embargo se recalca que según esta prueba comparativa dicho tratamiento es estadísticamente semejante al tratamiento 4, el mismo que obtuvo un promedio de 22.33 mm de diámetro de la región inhibitoria determinados por aztreonam.

A su vez los tratamientos 3 y 6 exhibieron semejanzas estadísticas comprendidos por ceftazidima y ceftriaxona correspondientemente, sin embargo, numéricamente el tratamiento 3 expresó un mayor promedio con 19.67 mm, siguiéndole el tratamiento 6 el cual obtuvo un promedio de 19 mm en la región inhibitoria del antibiograma.

Finalmente los tratamientos 1 y 2 expresaron igualdad estadística los cuales estan comprendidos por amoxicilina más ácido clavulánico y cefopodoxima respectivamente, discurrendo que, numéricamente el tratamiento 1 obtuvo el mayor promedio con 16.33 mm, con relación al tratamiento 2 que obtuvo un promedio con 15.67 mm en la zona de inhibición.

**Figura 4.**

*Promedios del impacto inhibitorio de los betalactámicos usados frente a Klebsiella spp., aislada de mastitis bovina.*



En el estudio investigativo de Demirci *et al.* (2023) estudiaron molecularmente los genes asociados a la producción de BLEE en *Klebsiella* spp., a partir de aislamientos de leche cruda de vacas, lograron aislar y caracterizar un total de 4 *Klebsiella* spp., de las cuales identificaron que 2 patógenos (50%) expresaron genes de resistencia definidos en varios *loci* a los cuales se les atribuye los patrones de resistencia mediados por BLEE, teniendo en cuenta que en las pruebas de susceptibilidad estos patógenos obtuvieron medidas de las regiones inhibitorias por debajo de los criterios interpretativos para ceftriaxona, mientras que para ceftazidima y cefotaxima tan solo un microbio fue resistente, consiguiendo medidas  $\leq 27$  mm en diámetro del área de inhibitoria. lo que hace referencia a un mayor grado de resistencia que en la actual experimentación.

#### 4.1.2.2.1. Categorización interpretativa de la susceptibilidad de *Klebsiella* spp., expuesta a los betalactámicos investigados.

**Tabla 16.**

*Medidas de los criterios categóricos de los antibióticos usados en las pruebas de susceptibilidad de Klebsiella spp.*

<b>Amoxicilina más ácido clavulánico (AMC 30µg)</b>			
<b>PUNTO DE CORTE</b>	<b>Sensible</b>	<b>Intermediamente R.</b>	<b>Resistente</b>
EUCAST (AMC 30µg)	$\geq 15$	-	$\leq 14$
CLSI	$\geq 18$	17-14	$\leq 13$
<b>Cefopodoxima (CPD 10µg)</b>			
<b>PUNTO DE CORTE</b>	<b>Sensible</b>	<b>Intermediamente R.</b>	<b>Resistente</b>
CLSI	$\geq 18$	-	$\leq 17$
<b>Ceftazidima (CAZ 30µg)</b>			
<b>PUNTO DE CORTE</b>	<b>Sensible</b>	<b>Intermediamente R.</b>	<b>Resistente</b>
CLSI	$\geq 23$	-	$\leq 22$
<b>Aztreonam (ATM 30µg)</b>			
<b>PUNTO DE CORTE</b>	<b>Sensible</b>	<b>Intermediamente R.</b>	<b>Resistente</b>
CLSI	$\geq 28$	-	$\leq 27$
<b>Cefotaxima (CTX 30µg)</b>			
<b>PUNTO DE CORTE</b>	<b>Sensible</b>	<b>Intermediamente R.</b>	<b>Resistente</b>
CLSI	$\geq 28$	-	$\leq 27$
<b>Ceftriaxona (CRO 30µg)</b>			
<b>PUNTO DE CORTE</b>	<b>Sensible</b>	<b>Intermediamente R.</b>	<b>Resistente</b>
CLSI	$\geq 26$	-	$\leq 25$

**Tabla 17.***Resultados de las pruebas de susceptibilidad de Klebsiella spp.*

<i>Klebsiella</i> <i>spp.</i>	Código	Amoxicilina + ácido clavulánico		Cefpodoxima		Ceftazidina		Aztreonam		Cefotaxima		Ceftriaxona	
		30	Categoría	10	Categoría	30	Categoría	30	Categoría	30	Categoría	30	Categoría
1	EA007PI	16	I	17	R	18	R	19	R	23	R	20	R
2	AR015PI	18	S	17	R	22	R	23	R	25	R	18	R
3	AE013PI	15	I	16	R	17	R	23	R	26	R	18	R
4	AE008PI	17	I	15	R	22	R	24	R	27	R	27	S
5	AR016AD	16	I	14	R	17	R	21	R	22	R	17	R
6	AR014PD	16	I	15	R	22	R	24	R	24	R	14	R

*Nota.* S; sensible, I: intermedicamente resistente, R: resistente.

**Tabla 18.**

*Índice de susceptibilidad de Klebsiella spp. con respecto los betalactámicos estudiados*

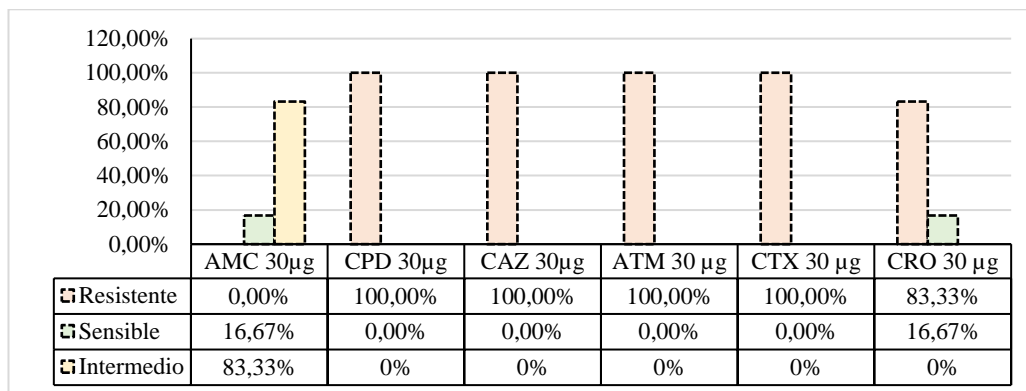
<b>Amoxicilina más ácido clavulánico (AMC 30µg)</b>			
<b>Criterio categórico</b>	<b>Sensible</b>	<b>Intermediamente R.</b>	<b>Resistente</b>
EUCAST	100%		0%
CLSI	16.67%	83.33%	-
<b>Cefpodoxima (CPD 30µg)</b>			
<b>Criterio categórico</b>	<b>Sensible</b>	<b>Intermediamente R.</b>	<b>Resistente</b>
CLSI	0%	-	100%
<b>Ceftazidima (CAZ 30µg)</b>			
<b>Criterio categórico</b>	<b>Sensible</b>	<b>Intermediamente R.</b>	<b>Resistente</b>
CLSI	0%	-	100%
<b>Aztreonam (ATM 30 µg)</b>			
<b>Criterio categórico</b>	<b>Sensible</b>	<b>Intermediamente R.</b>	<b>Resistente</b>
CLSI	0%	-	100%
<b>Cefotaxima (CTX 30 µg)</b>			
<b>Criterio categórico</b>	<b>Sensible</b>	<b>Intermediamente R.</b>	<b>Resistente</b>
CLSI	0%	-	100%
<b>Ceftriaxona (CRO 30 µg)</b>			
<b>Criterio categórico</b>	<b>Sensible</b>	<b>Intermediamente R.</b>	<b>Resistente</b>
CLSI	16.67%	-	83.33%

Las *Klebsiella* spp., presentaron distintos niveles de susceptibilidad en cada uno de los betalactámicos utilizados, evidenciando que al ser expuestos a amoxicilina más ácido clavulánico de 30 µg (AMC 30µg) el 100% de las cepas investigadas fueron sensibles de acuerdo con el manual del EUCAS (2023), mientras que referenciándose con manual M100 del CLSI (2023), se observó un 16.67% de sensibilidad y un 83.33% de resistencias intermedia.

Adicionalmente, se observó que en todas las cefalosporinas de tercera generación manejadas en el estudio de la caracterización fenotípica de la producción de BLEE, el 100 % de las *Klebsiella* spp se mostraron como resistentes a cefpodoxima de 10µg (CPD 10µg), ceftazidima de 30µg (CAZ 30µg), cefotaxima de 30µg (CTX 30µg) y aztreonam de 30µg (ATM 30µg) respectivamente, sin embargo a ceftriaxona de 30µg (CRO 30µg) la bacteria mencionada ostentó un 16.67% de sensibilidad y un 83.33% de resistencia.

**Figura 5.**

*Índice de susceptibilidad antimicrobiana de Klebsiella spp con respecto a los betalactámicos estudiados.*



En el manuscrito de Nobrega *et al.* (2021) sobre la caracterización fenotípica y molecular de betalactamasas de espectro extendido producidas por *Klebsiella spp.*, en vacas lecheras, de un total de 1547 muestra de leche recolectada para cultivo bacterianos se lograron discernir un total de 28 *Klebsiella pneumoniae* con una prevalencia estimada de 0.60 casos por cada 100 vacas muestreadas, de las cuales 2 muestras que procedían de casos clínicos de mastitis y 1 de leche del tanque reservorio fueron positivas a BLEE ya que se mostraron como resistentes a los fármacos utilizados entre ellos cefalosporinas de 3 generación. referente a los resultados obtenidos en nuestro ensayo son datos similares ya que se observó similar conducta tolerante a las cefalosporinas utilizadas por parte de *Klebsiella sp.*

En lo reportado por Enferad & Mahdavi (2020) sobre los niveles de resistencia a los antibióticos y frecuencia de algunos genes asociados a la producción de betalactamasa en *Klebisella pneumoniae* aisladas de muestras de leche cruda en Irán, los antibiogramas exhibieron que 4 aislados lo que representaba el 5% de la población en estudio fueron tolerantes a todos los antibióticos probados incluyendo los betalactámicos que recomienda el CLSI para caracterizar enterobacterias productoras de BLEE. considerando que son datos similares a los obtenidos en nuestros ensayos, debido que las *Klebsiella spp* en estudio exhibieron resistencia total a los betalactámicos utilizados, sin embargo, solo una *Klebisella spp.* expresó sensibilidad al inhibidor de betalactamasa (ácido clavulánico).

**4.1.3. Perfil de producción de betalactamasas de espectro extendido por parte *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp., obtenidas de mastitis bovina**

**Tabla 19.**

*Caracterización de betalactamasas de E. coli y Klebsiella spp.*

BACTERIA	CÓDIGO	SINERGIA	SUSCEPTIBILIDAD	AUMENTO > 5 MM	CRECIMIENTO EN PLACA	SUSCEPTIBILIDAD CEFOXITIN	TIPO DE BETALACTAMASA
<i>Escherichia coli</i>	AR001AI	-	S	✓	-	S	No clasifica
	AR013PI	-	R	-	✓	R	OTB
	D002PI	-	R	-	✓	R	OTB
	D003PI	✓	R	✓	✓	S	BLEE
	EA006PI	✓	R	✓	✓	S	BLEE
	AR004PD	-	S	✓	-	S	No clasifica
	EA007PI	-	R	-	✓	R	OTB
<i>Klebsiella spp.</i>	AR015PI	✓	R	✓	✓	S	BLEE
	AE013PI	-	R	-	✓	R	OTB
	AE008PI	-	R	-	✓	R	OTB
	AR016AD	-	R	-	✓	R	OTB
	AR014PD	-	R	-	✓	R	OTB

*Nota.* ✓; si se observó el efecto, -; no se observó el efecto, S; sensibles, R; resistente, OTB; otro tipo de betalactamasa.



Mediante la interacción farmacológica para la caracterización de cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) por medio de parámetros fenotípicos designados en los manuales del CLSI (2023), se identificó dos cepas de *E. coli* y una de *Klebsiella* spp. BLEE ya que exhibieron tolerancia a las cefalosporinas de tercera generación empleadas, monobactámicos y penicilinas, conjuntamente en la prueba de sinergia se logró identificar disturbios en los halos mediante proximidad farmacológica, también al utilizar ceftazidima (CAZ 30µg) y cefotaxima (CTX 30µg) solas y en compañía con el ácido clavulánico como inhibidor de las betalactamasas se distinguió un aumento  $\geq 5$ mm en las regiones inhibidas por efecto del agente inhibidor.

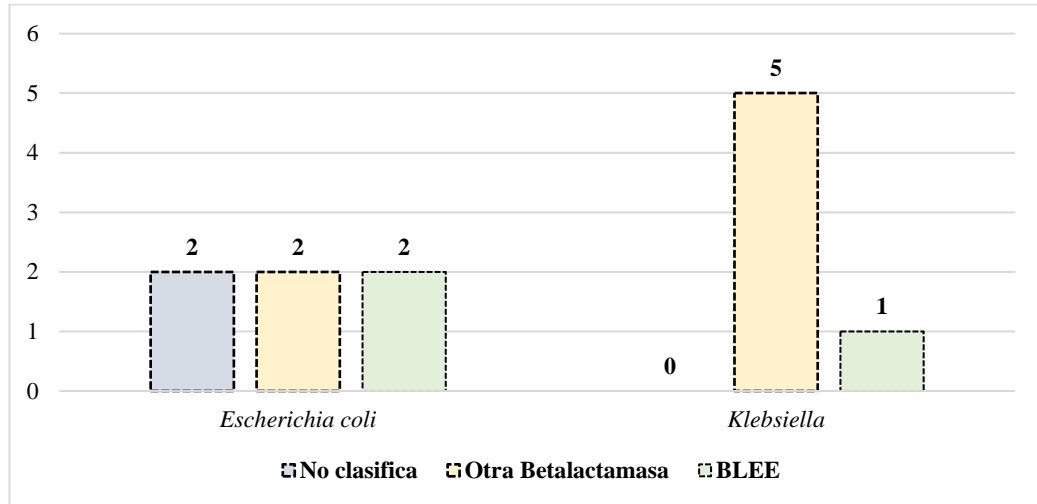
De la misma manera se cultivó una población bacteriana de  $1 \times 10^8$  en agar M. Hinton al cual se le agregó una concentración de 1 mg/L de ceftriaxona para la evaluación de crecimiento en placa con medio con antibiótico, encontrando que los microorganismos caracterizados como *E. coli* y *Klebsiella* spp., clasificadas como productoras de BLEE se desarrollaron en dicho medio exhibiendo su capacidad de tolerancia antibiótica favoreciendo dicho hallazgo para su caracterización.

Los estirpe de microorganismos en estudio que no lograron ser catalogadas como productoras de BLEE, no completaban los parámetros de evaluación antes citados, ya que se evidenció que en las pruebas de susceptibilidad, el mecanismo de acción de los inhibidores de betalactamasa no desencadenaron variaciones por aumento en el diámetro de las zonas inhibitorias en el antibiograma con ceftazidima (CAZ 30µg) y cefotaxima (CTX 30µg) solas y en combinación con el ácido clavulánico, en función a estos hallazgos se categorizaron como productoras de betalactamasas de otro tipo o como cepas productoras de BLEE falsos positivos, y se plantea la hipótesis de que pueden coexistir la producción de BLEE y además de otro tipo como las AmpC, expresando resistencia a todos los betalactámicos incluyendo a los inhibidores como menciona Martínez (2009).

Del total de microbios reconocidos como *E. coli* dos se mostraron como sensibles a los  $\beta$ -lactámicos utilizados, dicha categorización intervino directamente para clasificarse como no productoras de BLEE debido a la no existencia de sustancias que les confiera tolerancia a los medicamentos mencionados.

**Figura 6.**

*Caracterización fenotípica de BLEE en E. coli y Klebsiella spp., causante de mastitis.*



El-Mohandes *et al.* (2022), investigación científica referida al estudio del fenotipado y genotipado de *E. coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido de casos mastíticos en granjas lecheras de Egipto, comprobó que de 207 muestras se logró reconocer a *E. coli* en un 80.48% de casos clínicos, encontrando 79 cepas (38.2%) como productora de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) mediante pruebas fenotípicas de difusión de disco. Referente a nuestro hallazgo se puede determinar que son datos muy semejantes, sin embargo, hay que considerar que dicho valor esta en dependencia del nivel de producción lechera e intensificación productiva.

#### 4.1.4. Índice de prevalencia de las enterobacterias productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) responsables de mastitis.

**Tabla 20.**

*Prevalencia de los patógenos productores de BLEE.*

BACTERIA	BLEE	PREVALENCIA
<i>Escherichia coli</i>	2	33.33%
<i>Klebsiella</i>	1	16.67%
<b>Total</b>	3	25%

Mediante la caracterización fenotípica de las cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido por medio del método difusión de disco se pudo determinar que las *Escherichia coli* en estudio expresaron un 33.33% de prevalencia para BLEE y *Klebsiella* spp., un 16.67% de prevalencia, adicionalmente se considero un 25% de prevalencia total para la presente investigación.

En la investigación de Gelalcha & Kerro (2022) sobre una recopilación de investigaciones sobre enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido realizadas en granjas de ganado lechero de EE.UU e implicaciones para la salud pública, determinan que *Escherichia coli* productora de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) de características CTX se puede encontrar desde un 20.5% en granjas lecheras de Tennessee, también en otras investigaciones citadas en dicho artículo menciona que en 28 granjas lecheras ubicadas en Washington las *E. coli* BLEE se identifico en un 50%, adicionalmente mencionan que *Klebsiella pneumoniae* productora de BLEE presente una prevalencia del 2.8% en cuatro granjas de Nueva York y un 6.6% para muestras positivas a mastitis clínicas de granjas de California.

Adicionalmente la investigación antes mencionada concluye que estas cepas bacterianas productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) se encuentran en tendencia creciente en el ganado lechero, lo que podría representar un riesgo importante para la salud pública, debido a que algunas de estas bacterias son zoonóticas y pueden transmitirse a los humanos a través de diversas rutas, además, los genes que le propician resistencias antimicrobiana puede transferirse a otros géneros bacterianos de diferentes huéspedes (humanos) conduciendo a la transmisión de resistencia provocando el aumento de la mortalidad por falla de la terapéutica.

Comparativamente la prevalencia de *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp., productoras de BLEE es muy variado y está en dependencia de múltiples factores, estableciéndose desde un 2% hasta un 50% de granja a granja y de país a país la expresión de genes productores de BLEE, sin embargo, los autores citados en esta investigación mencionan el riesgo que representa el aumento de cepas productoras de BLEE, ya que puede repercutir en la salud pública humana por medio de leche

contaminada de este tipo de bacteria, por ello, se establece como una interrogante la transmisión antropozoonótica originada por los operarios y personal de las granjas lecheras hacia las vacas productoras de leche, ya que en el Ecuador en la actualidad las cefalosporinas de 3 generación no son utilizadas para el tratamiento de mastitis pero si en terapias antibióticas en medicina humana.

#### **4.2. COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS**

Los análisis realizados permitieron inferir que existió una prevalencia total del 25% (3/12) de enterobacterias productoras de BLEE causantes de mastitis, nuestros hallazgos investigativos se basaron en la expresión dicho mecanismo de resistencia por parte de 2 cepas *Escherichia coli* y 1 de *Klebsiella* spp., de manera que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna la misma que expresa; existe producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) identificadas mediante pruebas fenotípicas de susceptibilidad por parte de *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp., aisladas de mastitis bovina.

## CAPÍTULO V

### 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. CONCLUSIONES

- Metodológicamente mediante pruebas de reconocimiento fenotípicas y bioquímicas se puede determinar que los 12 aislados en estudio cumplían con las características metabólicas de identificación, observando que 6 microorganismos pertenecían al género *Escherichia coli* y los 6 restantes pertenecían al género *Klebsiella* spp., los cuales se consideraron como óptimos para la experimentación.
- Mediante los resultados de las pruebas de susceptibilidad farmacológica obtenidos y relacionados con las medidas categóricas de los manuales del CLSI (2023) y el EUCATS (2023), se infirió que 2 bacterias reconocidas como *E. coli* fueron sensibles a todos los antibióticos analizados, mientras que los 4 microorganismos restante se exhibieron como resistentes, a si mismo a nivel del género *Klebsiella* spp., los 6 aislados expresaron resistencia total a todos los fármacos en estudio.
- Mediante el cumplimiento de los parámetros de caracterización fenotípica se pudo determinar que 3 aislados expresaron producción BLEE, además se presenció que 7 aislados manifestaron la producción de otro tipo de betalactamasas, debido a su comportamiento en la interacción con los antibióticos estudiados, encontrando la coexistencia de dos o más tipos de betalactamasas que impidieron que las de tipo BLEE se manifesten apropiadamente.
- Las  $\beta$ -lactamasas se encontraron prevalecientes en una índice del 25%, evidenciando que el 33.33% (2/6) *E. coli* se categorizaron interpretativamente como productoras de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE), así mismo el 16.67% (1/6) de las *Klebsiella* spp., estudiadas manifestaron dicho mecanismo de resistencia.

## 5.2. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio genético molecular para determinar la presencia de los genes que le otorgan la producción de las BLEE en los microorganismos investigados que les permite ser resistentes a la mayoría de  $\beta$ -lactámico y monobactámicos.
- Caracterizar fenotípicamente y molecularmente la presencia y producción de las betalactamasas de tipo AmpC en *Klebsiella* y *E coli* en cuadros clínicos de infecciones intramamarias.
- Determinar mediante PCR el grado de mutación del cromosoma o la presencia del plásmido responsable de resistir al mecanismo de acción de los inhibidores de betalactamasas.
- Analizar las divergencias genéticas que presentaron las *E coli* sensibles y productoras de BLEE a todos los antibióticos que se experimentaron.
- Ensayar diferentes pruebas de susceptibilidad y resistencias de las bacterias en estudio a los carbapenémicos y cefalosporinas de cuarta generación más utilizados en las terapéuticas antibióticas veterinarias con la finalidad de encontrar la producción de carbapenemasas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bianchi, R., Schwertz, C., De Cecco, B., Panziera, W., De Lorenzo, C., Heck, L., Driemeier, D. (2019). Pathological And Microbiological Characterization Of Mastitis In Dairy Cows. *Tropical Animal Health And Production*, 51(7), pp. 2057 – 2066.
- Blum, S., Heller, D., Jacoby, S., Krifuks, O., Merin, U., Silanikove, N., Leitner, G. (2020). Physiological Response Of Mammary Glands To *Escherichia coli* Infection: A Conflict Between Glucose Need For Milk Production And Immune Response. *Scientific Reports*, 10, pp. 9602.
- Bush, K., & Bradford, P. (2020). Epidemiology Of Beta-Lactamase Producing Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(2), pp. E00047-19.
- Calles, D., Gamboa, M., & Álvarez, E. (2022). Resistencia A Antibióticos Betalactámicos: Situación Actual Y Nuevas Estrategias. *Rd-Icuap*, 8(22), pp.13 – 27.
- Campos, F., Castilho , I., Rossi , B., Bonsaglia , É., Dantas , S., Dias, R., Rall, V. (2022). Genetic And Antimicrobial Resistance Profiles Of Mammary Pathogenic *E. coli* (Mpec) Isolates From Bovine Clinical Mastitis. *Pathogens*, 11(12), pp. 1435.
- Castanheira, M., Simner, P., & Bradford, P. (2021). Beta-Lactamasas De Espectro Extendido: Actualizacion De Sus Características, Epidemiología Y Detección. *Resistencia Antimicrobiana Jac*, 3(3), pp. Dlab092.
- Cheng, J., Zhang, J., Han, B., Barkema, H., Cobo, E., Kastelic, J., Gao, J. (2020). *Klebsiella pneumoniae* Isolated From Bovine Mastitis Is Cytopathogenic Fron Bovine Mammary Epithelial Cells. *Journal Of Dairy Science*, 103(4), pp. 3493-3504.
- Clsi. (2022). M1000- Ed32: Performance Standards For Antimicrobial Susceptibility Testing. Clsi.
- Clsi. (2023). Performance Standards For Antimicrobial Susceptibility Testing. Clsi, M100-Ed33.



- Cruz, A., Toro, V., Munguía, C., Torres, J., Flores, L., Loeza, P., & Jiménez, R. (2020). Relación Genética, Formación De Biopelículas, Movilidad Y Virulencia De *Escherichia coli* Aislada De Mastitis Bovina. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 11(1), pp. 167 – 182.
- Demirci, M., Yigin, A., Altun, S., & Ekici, S. (2023). A Molecular Investigation Of Extended Spectrum Beta-Lactamase Genes In *Escherichia coli* And *Klebsiella* spp. In Raw Cow Milk. *Turkish Journal Of Veterinary Research*, 7(1), pp. 1-5.
- El-Mohandes, S., Eid, R., Allan, A., Zeina, H., & Elbayoumy, M. (2022). Phenotyping And Genotyping Studies On Extended-Spectrum B-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates From Mastitic Cows On Dairy Farms In Egypt. *Veterinary World*, 15(4), pp. 890-897.
- Enferad, E., & Mahdavi, S. (2020). Antibiotic Resistance Pattern And Frequency Of Some Beta Lactamase Genes In *Klebsiella pneumoniae* Isolated From Raw Milk Samples In Iran. *Journal Of The Hellenic Veterinary Medical Society*, 71(4), pp. 2455-2462.
- EUCAST. (2023). Amoxicillin-Clavulanic Acid. International Zone Diameter Distribution- Rederence Database 2023. Eucast Disk Diffusion Method.
- Gelalcha, B., & Kerro, O. (2022). Extended.Spectrum Beta-Lactamases Producing Enterobacteriaceae In The Usa Dairy Cattle Farms And Implications For Public Health. *Antibiotics*, 11(10), pp. 1313.
- Gelalcha, B., Ensermu, D., Agga, G., Vancuren, M., Gillespie, B., D'souza, D., Dego, O. (2022). Prevalence Of Antimicrobial Resistantand Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *51Escherichia Coli*in Dairy Cattle Farms In East Tennessee. *Foodborne Pathogens And Disease*, 19(6), pp. 408-416.
- Goulart, D., & Mellata, M. (2022). Mastitis Por *Escherichia coli* En Ganado Lechero: Etiología, Diagnóstico Y Desafío Del Tratamiento. *Frontiers In Microbiology*, 13, pp. 928346.

- Hamon, A., Bastidas, F., & Lefort, A. (2021). Betalactámicos. *Emc-Tratado De Medicina*, 25(2), pp. 1 – 7.
- Hincapié, P., Gacía , J. L., Gómez , D., Mejía , L., Holguín , A., Uribe , P., Berrouet , M. (2021). Reacciones Adversas A Betalactámicos: Una Revisión De Tema. *Medicina Upb*, 40(1), pp. 55 – 64.
- Holdridge, L. (1971). Sistema De Zonas De Vida. En L. Holdridge.
- Instituto Nacional De Meteorología E Hidrología. (2021). Instituto Nacional De Meteorología E Hidrología. Obtenido De Inamhi: <https://www.inamhi.gob.ec/>.
- Kayitsinga, J., Schewe, R., Contreras, G., & Erskine, R. (2017). Antimicrobial Treatment Of Clinical Mastitis In The Eastern United States: The Influence Of Dairy Farmers Mastitis Management And Treatment Behavior And Attitudes. *Journal Of Dairy Science*, 100(2), pp. 1388 – 1407.
- Krömker, V., & Leimbach, S. (2017). Mastitis Treatment – Reduction In Antibiotic Usage In Dairy Cows. *Wiley Reproduction In Domestic Animals*, 52(3), pp. 21 – 26.
- Lindstedt, B. A., Finton, M. D., Porcellato, D., & Brandal, L. T. (2018). High Frequency Of Hybrid *Escherichia Coli* Strains With Combined Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* (Ipec) And Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (Expec) Virulence Factors Isolated From Humane Faecal Samples. *Bmc Infectious Diseases*, 18, pp. 544.
- Liu, K., Zhang, L., Gu, X., & Qu, W. (2022). The Prevalence Of *Klebsiella* spp. Associated With Bovine Mastitis In China And Its Antimicrobial Resistance Rate: A Meta-Analysis. *Frontiers In Veterinary Science*, 9, pp. 757504.
- Martínez, D. (2009). Betalactamasas Tipo Ampc: Generalidades Y Métodos Para Detección Fenotípica. *Revista De La Sociedad Venezolana De Microbiología*, 29(1), pp. 78-83.

- Massé, J., Dufour, S., & Archambault, M. (2020). Characterization Of *Klebsiella* Isolates Obtained From Clinical Mastitis Cases In Dairy Cattle. *Journal Of Dairy Science*, 103(4), pp. 3392-3400.
- Matta, J., Valencia, E., Sevilla, C., & Barrón, H. (2022). Filogenia Y Resistencia De Cepas De *Escherichia coli* Productoras De Betalactamasa De Espectro Extendido A Los Antibióticos En Pacientes Con Cáncer Hospitalizados En Perú. *Biomédica*, 42(3), pp. 470-478.
- Mazón, J., Mazón, D. (2022). Análisis De Resistencia Y Susceptibilidad Antimicrobiana En Bacterias Aisladas De Mastitis Bovina En La Cooperativa Agropecuaria “La Colina”, Provincia De Pichincha (Ecuador). Tesis De La Universidad Estatal De Bolívar.
- Motaung, T., Kiro, R., Inge-Marie, P., Oriol, T., & Toi, T. (2017). Importance Of Bovine Mastitis In Africa. *Animal Health Research Reviews*, 18(1), pp. 58-69.
- Muleme, J., Kankya, C., Munyeme, M., Musoke, D., Ssempebwa, J., Isunju, J., Kajumbula, H. (2023). Phenotypic Characterization And Antibigrams Of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolated At The Human-Animal- Environment Interface Using A One Health Approach Among Households In Wakiso District, Uganda. *Infection And Drug Resistance*, 16, pp. 2223-2216.
- Mushtaq, S., Shah, A., Shah, A., Lone, S., Hussain, A., Hassan, Q., & Ali, M. (2018). Mastitis Bovina: Una Evaluación De Su Cura Alternativa A Base De Hierbas. *Patogenia Microbiana*, 114, pp. 357-361.
- Nawel, Z. (2022). An Overview On Mastitis-Associated *Escherichia Coli*: Pathogenicity, Host Immunity And The Use Of Alternative Therapies. *Microbiological Research*, 256, pp. 126960.
- Nóbrega, D., Calarga, A., Nacimiento, L., Vasconcelos, C., De Lima, E., Langoni, H., & Brocchi, M. (2021). Molecular Characterization Of Antimicrobial Resistance In *Klebsiella Pneumoniae* Isolated From Brazilian Dairy Herds. *Jornal Of Dairy Science*, 104(6), pp. 7210-7224.

- Oliveira, A., Reis, E., Ferraz, P., Barbari, M., Santos, G., Cruz, M., Silva, A. (2022). Termografía Infrarroja Como Técnica De Detección De Mastitis Bovina Subclínica. *Archivo Brasileño De Medicina Veterinaria Y Zootecnia*, 74(6), pp. 992 – 998.
- Plumb, D. C. (2017). Manual De Farmacología Veterinaria (Vol. Octava Edición). Buenos Aires, República Argentina: Inter-Medica.
- Poizat, A., Bonnet, F., Rault, A., Fourichon, C., & Bareille, N. (2017). Antibiotic Use By Farmers To Control Mastitis As Influenced By Health Advice And Dairy Farming Systems. *Preventive Veterinary Medicine*, 146, pp.61 – 72.
- Ribeiro, M., Motta, R., Pas, C. A., Allendorf, S., Salerno, T., Siqueira, A., Lara, G. (2008). Mastitis Bovina Hiperaguda Causada Por *Klebsiella pneumoniae*. *Archivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia*, 60 (2), pp. 485 – 488.
- Roca, L., Vizuete, J., & Navarro, A. (2019). Estrategias De Optimización De Uso De Betalactámicos. *Revista Electrónica Anestesiología*, 11(9), pp. 3.
- Rodríguez, A., Moreno, G., Bodi, M., & Martín-Loeches, I. (2022). Antibióticos En Desarrollo Para Bacilos Gram Negativos Multirresistentes. *Medicina Intensiva*, 46(11), pp. 630 – 640.
- Rojas, R., Baeder, D., Johnston, P., Regoes, R., Rolff, J. (2021). Bacteria Primed By Antimicrobial Peptides Develop Tolerance And Persist. *PLoS Pathog.* 7(3). pp. e1009443. Doi; <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009443>.
- Rosales, R. E., & Granja, V. M. (2017). Infusión Continua De Betalactámicos Generalidades. *Eipediatria.Com*, pp. 1129-1133.
- Ruegg, P. (2017). Una Revisión De 100 Años: Detección, Manejo Y Prevención De Mastitis. *Journal Of Dairy Science*, 100(12), pp. 10381-10397.

- Sawa, T., Kooguchi, K., & Moriyama, K. (2020). Diversidad Molecular De Beta-Lactamasas Y Carbapenemasas De Espectro Extendido Y Resistencia A Los Antimicrobianos. *Journal Of Intensive Care*, 28(8), pp. 13.
- Stempler, A., Muñoz, A., & Lucas, M. (2022). *Streptococcus uberis* Y Su Importancia Como Agente Causal De La Mastitis Bovina. *Revista Veterinaria (Unne)*, 33(2), pp. 192-201.
- System, I. I. (2023). *Escherichia coli* (Migula, 1895) Castellani And Chalmers 1919 / Taxonomy And Nomenclatura. Itis.
- Taniguchi, T., Latt, K., Tarigan E, Yano F, Sato, H., Minamino, T., & Misawa, N. (2021). A 1 Year Investigation Of Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing *Escherichia coli* And *Klebsiella pneumoniae* Isolated From Bovine Mastitis At A Large-Scale Dairy Farm In Japan. *Microbiological Drug Resistance*, 27(10), pp. 1450-1454.
- Ugbo, E., Anyamene, C., Moses, L., Iroha, I., Babalola, O., Ukpai, E., Ugadu, I. (2020). Prevalence Of Blatem, Blashv, And Blactx-M Genes Among Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* And *Klebsiella pneumoniae* Of Clinical Origin. *Gene Reports*, 21(2020), pp. 100909.
- Vega, L., Márquez, A., De La Cruz, B., Torres, A., & Richardo, A. (2019). Determinación Del Efecto Antagónico De Bacteriófagos Sobre Géneros De Bacterias Potenciales Causantes De Mastitis Bovina (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Pseudomonas* spp., y *Escherichia coli*) En Plamplona, Norte De Santander. *Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, 4(2), pp. 82-85.
- Widodo, A., Lamid, M., Effendi, M., Khailrullah, A., Kurnaiawan, S., Silaen, O., Ramandinianto, S. (2023). Antimicrobial Resistance Characteristics Of Multidrug Resistance And Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing *Escherichia coli* from several Dairy Farms In Probolinggo, Indonesia. *Biodiversitas*, 24(1), pp. 215-221.

- Zaatout, N. (2022). An Overview On Mastitis – Associated *Escherichia coli*: Pathogenicity, Host Immunity And The Use Of Alternative *Therapies*. *Microbiological Research*, 256, pp. 126960.
- Zhang, D., Zhang, Z., Huang, C., Gao, X., Wang, Z., Liu, Y., Liu, M. (2018). The Phylogenetic Group, Antimicrobial Susceptibility, And Virulence Genes Of *Escherichia coli* From Clinical Bovine Mastitis. *Journal Of Dairy Science*, 101, pp. 572-580

# ***ANEXOS***

**Anexo 1.**

*Mapa de ubicación de la investigación*



Fuente: Google maps (2023).

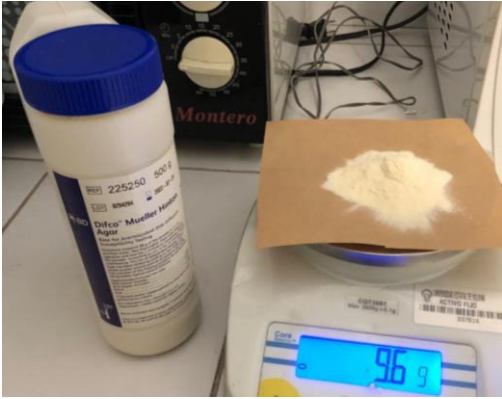


**Anexo 2.***Base de datos*

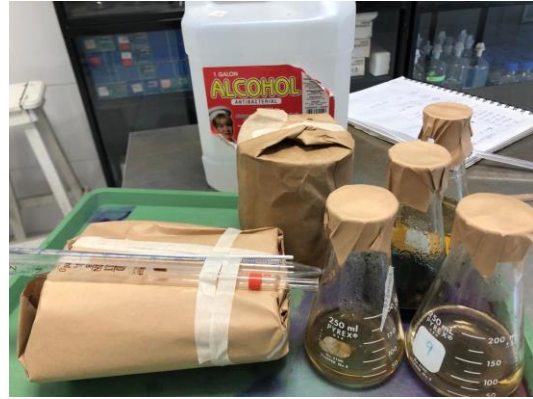
	<b>Tra</b>	<b>1 (AMC)</b>	<b>2 (CPD)</b>	<b>3 (CAZ)</b>	<b>4 (ATM)</b>	<b>5 (CTX)</b>	<b>6 (CRO)</b>	<b>CAZ +AC c.</b>	<b>CTX + AC c.</b>	<b>Fox 30</b>
	<b>Codigo</b>									
<i>Escherichia coli</i>	AR001AI	18	20	24	28	28	26	30	33	20
	AR013PI	17	17	22	23	24	24	23	24	15
	D002PI	17	17	22	23	26	25	22	26	14
	D003PI	15	13	22	21	24	25	27	29	19
	EA006PI	14	15	21	22	26	25	21	24	20
	AR004PD	18	20	23	28	28	27	28	33	25
<i>Klebsiella</i>	EA007PI	16	17	18	19	23	20	19	19	16
	AR015PI	18	17	22	23	25	18	27	31	18
	AE013PI	15	16	17	23	26	18	19	21	17
	AE008PI	17	15	22	24	27	27	21	24	16
	AR016AD	16	14	17	21	22	17	17	24	14
	AR014PD	16	15	22	24	24	14	23	24	12

### Anexo 3.

#### Fotografías de la investigación



Fotografía 1: Preparación de medios de cultivo



Fotografía 2: Preparación de medios de cultivo



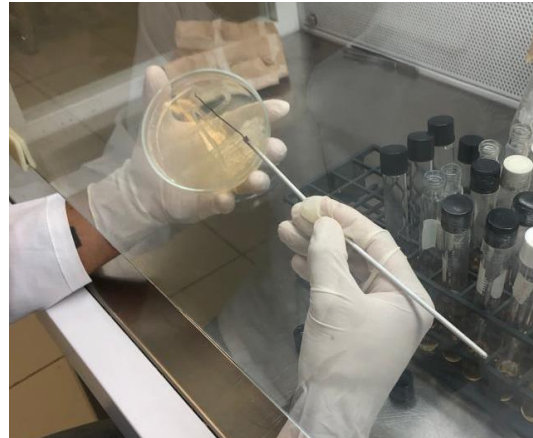
Fotografía 3: Preparación de medios de cultivo



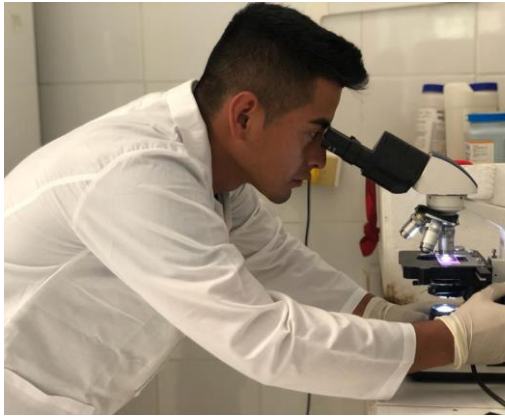
Fotografía 4: Preparación de medios de cultivo



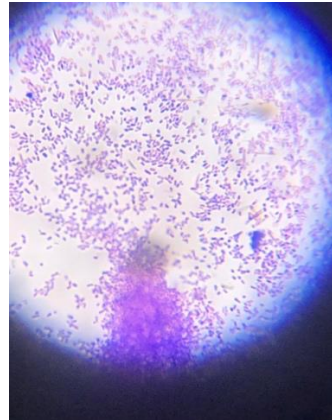
Fotografía 5: Reanimación de capas bacterianas



Fotografía 6: Siembra de cepas bacterianas en estudio



Fotografía 7: Tinción de GRAM



Fotografía 8: Bacterias Gram-negativas



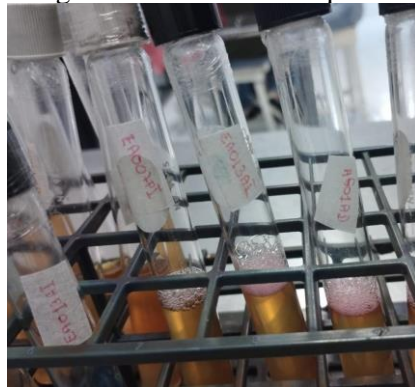
Fotografía 9: Pruebas Bioquímicas



Fotografía 10: Pruebas Bioquímicas



Fotografía 11: Pruebas bioquímicas



Fotografía 12: Resultados de las pruebas bioquímicas



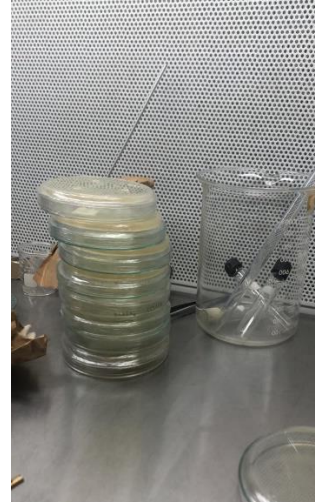
Fotografía 13: Antibióticos usados



Fotografía 14: Escala de turbidez



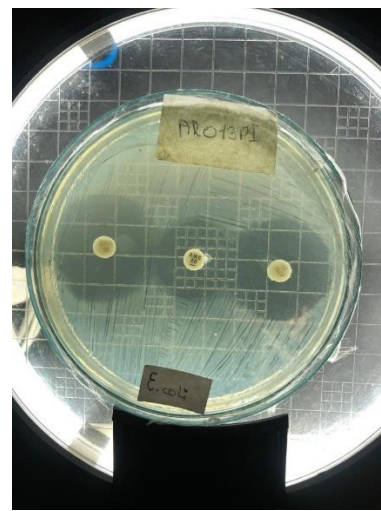
Fotografía 15: siembra de discos de antibiótico



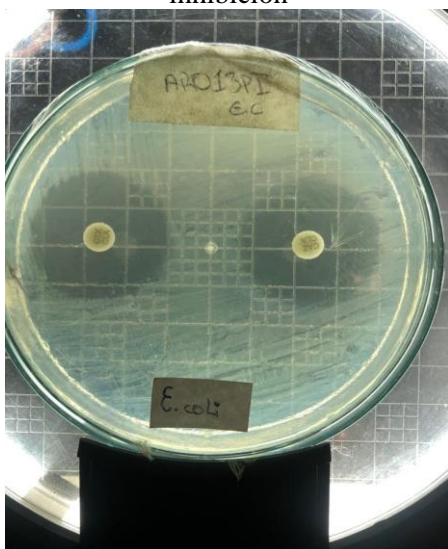
Fotografía 16: Placas patria lista para incubación.



Fotografía 17: Medición de los halos de inhibición



Fotografía 18: Resultados del antibiograma



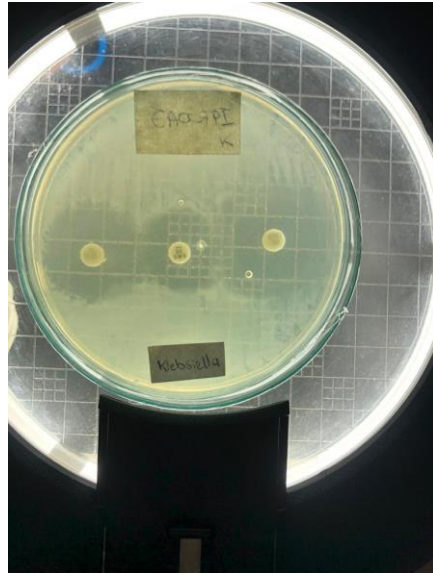
Fotografía 19: Resultados del antibiograma



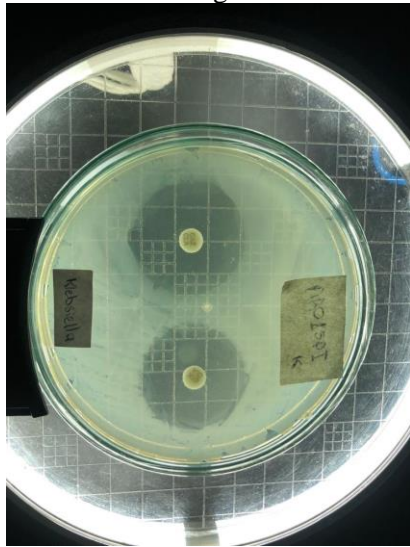
Fotografía 20: Resultados del antibiograma



Fotografía 22: Resultados del antibiograma



Fotografía 22: Resultados del antibiograma



Fotografía 23: Resultados del antibiograma



Fotografía 24: Visita de campo por parte del tribunal.

#### **Anexo 4.**

##### *Glosario de términos.*

- **ANTIBIOGRAMA:** El antibiograma es la prueba microbiológica que se realiza para determinar la susceptibilidad (sensibilidad o resistencia) de una bacteria a un grupo de antibióticos. Las técnicas de antibiograma son las utilizadas en el laboratorio de microbiología para estudiar la actividad de los antimicrobianos frente a los microorganismos responsables de las infecciones.
- **ANTIBIÓTICO:** También denominados antibacterianos, son unas moléculas que bloquean el crecimiento de ciertas bacterias y se prescriben habitualmente para tratar infecciones bacterianas y ciertos parásitos.
- **BACTERIA:** Las bacterias son microorganismos procariotas que presentan un tamaño de unos pocos micrómetros (por lo general entre 0,5 y 5  $\mu\text{m}$  de longitud) y diversas formas, incluyendo filamentos, esferas (cocos), barras (bacilos), sacacorchos (vibrios) y hélices (espirilos).
- **B-LACTÁMICO:** Clase de antibiótico que inhibe la síntesis de peptidoglicano para la pared de la célula bacteriana.
- **COLIFORME:** Término impreciso que se refiere a bacterias facultativas gramnegativas que por lo general residen en los intestinos.
- **CONJUGACIÓN:** Proceso que transfiere DNA de una célula bacteriana a otra.
- **ENDOTOXINA** Fracción lipopolisacárida tóxica de la membrana externa de las células bacterianas gramnegativas.
- **ENTEROBACTINA** Sideróforo tipo fenolato producido por *E. coli* y algunas otras especies entéricas de bacterias.
- **FAGOLISOSOMA:** La vacuola digestiva formada por la fusión de los lisosomas celulares con la vacuola fagocítica.
- **FÁRMACO DE ESPECTRO AMPLIO:** Que inhibe una amplia variedad de bacterias gramnegativas y grampositivas.

- **FASE DE LATENCIA:** Periodo durante el ciclo de cultivo en el que no se detecta crecimiento alguno.
- **FASE ESTACIONARIA:** Periodo en el ciclo de cultivo en el que se detiene el crecimiento.
- **FENOTIPO:** Propiedades expresadas por el genoma completo en condiciones particulares.
- **GEN:** Secuencia de DNA que codifica para un polipéptido o molécula de RNA.
- **GÉNERO:** Grupo bien definido de especies que se distingue claramente de otros microorganismos.
- **IN VITRO:** Que sucede dentro de un laboratorio bajo condiciones ambientales controladas
- **INMUNIDAD ADQUIRIDA:** Inmunidad que se desarrolla después de la exposición a agentes infecciosos o por medio de infusión de anticuerpos.
- **LACTOFERRINA:** Proteína fijadora de hierro presente en la leche, otras secreciones y en los gránulos de los neutrófilos.
- **MEMBRANA EXTERNA:** Segunda membrana externa del peptidoglucano que únicamente se encuentra en bacterias gramnegativas.
- **MUTACIÓN:** Mutación de reemplazo en un codón que cambia la transcripción del mRNA a un aminoácido distinto.
- **PERIODO DE INCUBACIÓN:** Tiempo entre la exposición a un organismo y la aparición de los primeros síntomas.
- **SEPTICEMIA:** Término clínico que indica evidencia de enfermedad sistémica asociada con la presencia de organismos en la sangre
- **TOXINA ESTABLE (ST):** Un péptido pequeño que se une a un receptor de glucoproteína y es estable ante el calentamiento.