

UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLIVAR

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TEMA:

"ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE CIPROFLOXACINA Y ESTREPTOMICINA EN LOS GÉNEROS *Escherichia* Y *Arcobacter* AISLADAS DE AGUA Y ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL"

Trabajo de titulación auspiciado por el proyecto de investigación: "Detección de patógenos mediante m-PCR para determinar la calidad del agua potable del cantón Chimbo" previo a la obtención del Título de Médico Veterinario y Zootecnista, otorgado por la Universidad Estatal de Bolívar a través de la Facultada de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

AUTOR:

FELIPE SEBASTIAN VASCONEZ VINZA

DIRECTOR:

Dr. EDISON RIVELIÑO RAMÓN C. M.Sc.

GUARANDA – ECUADOR

2019

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE CIPROFLOXACINA Y ESTREPTOMICINA EN LOS GÉNEROS *ESCHERICHIA* Y *ARCOBACTER* AISLADAS DE AGUA Y ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL.

APROBADO POR LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL.

…….…….

Dr. EDISON RIVELIÑO RAMÓN C. M.Sc.

DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.

…….…….

Ing. FAVIÁN BAYAS MOREJÓN. PhD.

ÁREA DE BIOMETRIA

…….…….

Dr. DANILO YÁNEZ SILVA. M.Sc.

ÁREA DE REDACCIÓN TÉCNICA

CERTIFICACIÓN DE AUTORÍA

Yo, FELIPE SEBASTIAN VASCONEZ VINZA, autor declaro que el trabajo aquí escrito es de mi autoría, este documento no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; que las referencias bibliográficas que se incluyen han sido consultadas con sus respectivos autores.

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, por su Reglamento y normativa institucional vigente.

……..

FELIPE SEBASTIAN VASCONEZ VINZA

CI: 0202086096

……..

Dr. EDISON RIVELIÑO RAMÓN C. M.Sc.

DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.

…….

Ing. FAVIÁN BAYAS MOREJÓN. PhD.

ÁREA DE BIOMETRÍA.

……..

Dr. DANILO YÁNEZ SILVA. M.Sc.

ÁREA DE REDACCIÓN TÉCNICA

DEDICATORIA

“No es grande el que siempre triunfa, si no el que jamás se desalienta”

José Luis Martin Descalzo.

Dedico este trabajo de investigación con profundo amor a mis padres y hermanos quienes me apoyaron incondicionalmente para alcanzar mi meta como Médico Veterinario y Zootecnista.

He llegado acá gracias a ustedes y a su luchar constante, sería injusto no dedicarles mi proyecto de titulación. Gracias de todo corazón.

AGRADECIMIENTO

“Por muy larga que sea la tormenta, el sol siempre vuelve a brillar entre las nubes” Khalil Gibran.

A Dios por la bendición, su amor y su bondad son infinitos sin su presencia en mi vida nada de esto sería posible, aunque camine por valles sombríos no temeré mal alguno, porque tu estarás conmigo.

Mi profundo agradecimiento al Doctor Ulises Barragán Vinueza, Rector de la Universidad Estatal de Bolívar por el apoyo brindado hacia mi persona.

A Lisseth por todo el cariño entregado y sobre todo por ser mi compañera en este tiempo, por dedicarme su amor, por ser mi guía, que aún en difíciles momentos siempre estuvo a mi lado, gracias por confiar en mi tal vez cuando nadie confiaba que lograría esta meta, estaré agradecido de por vida. Te amo.

Como no agradecer a mi tribunal de Tesis, a mi tutor Dr. Riveliño Ramón por su paciencia, al Dr. Danilo Yánez por su colaboración y al Dr. Favián Bayas por su conocimiento y desinteresada contribución, gracias por ayudarme a concluir esta meta trazada.

RESUMEN

En esta investigación se estudió la actividad antimicrobiana de Ciprofloxacina y Estreptomicina en los géneros *Escherichia* y *Arcobacter* aisladas de agua y alimentos de origen animal., así que nos planteamos; reanimar microorganismos de los géneros en estudio, extraer ADN de los aislados y amplificar el ADN obtenido mediante PCR (Reacción en cadena de la polimerasa). Y por último analizar de la Actividad Antimicrobiana de Ciprofloxacino y Estreptomicina sobre las cepas obtenidas. Para la actual investigación. De las 60 muestras de aislados de quesos, agua y carnes que fueron extraídos su ADN, 60 fueron positivos para bacterias de los géneros *Arcobacter* y *Escherichia* mediante la prueba de PCR., además se realizó el estudio de la actividad antimicrobiana de Ciprofloxacina y Estreptomicina mediante la técnica Kirby-Bauer para los cuales pudimos observar que para el tratamiento (T1) con una concentración mínima de fármaco (1 µg), se exhibió un 100% de resistencia bacteriana por parte de los dos géneros en estudio frente a Estreptomicina y Ciprofloxacina, se demostró que el tratamiento T2 con una concentración de 2 µg, es la mínima concentración de fármaco necesaria para producir una inhibición parcial de la bacteria (10/20 casos); para T0 (testigo), T3 y T4 ningún aislado de Escherichia y Arcobacter presentó resistencia antimicrobiana a los fármacos en estudio, al igual que T5 (10 µg) al cuál las dos bacterias en estudio fueron susceptibles en su totalidad.

Palabras claves: *Arcobacter spp, Escherichia spp*, PCR, Quesos, Carnes, Agua, Estreptomicina, Ciprofloxacina.

SUMMARY

In this investigation the antimicrobial activity of Ciprofloxacin and Streptomycin in the Escherichia and Arcobacter genera isolated from water and food of animal origin was studied, so we considered; resuscitate microorganisms of the genera under study, extract DNA from the isolates and amplify the DNA obtained by PCR (Polymerase chain reaction). And finally analyze the Antimicrobial Activity of Ciprofloxacin and Streptomycin on the strains obtained. For the current investigation of the 60 samples of cheese, water and meat isolates that were extracted from their DNA, 60 were positive for bacteria of the genera Arcobacter and Escherichia by means of the PCR test. In addition, the study of the antimicrobial activity of Ciprofloxacin and Streptomycin was performed by the Kirby-Bauer technique for which we could observe that for the treatment (T1) with a minimum concentration of drug (1 µg), 100% bacterial resistance was exhibited by the two genera under study against Streptomycin and Ciprofloxacin, it was shown that the T2 treatment with a concentration of 2 µg, is the minimum concentration of drug necessary to produce a partial inhibition of the bacteria (10/20 cases); for T0 (control), T3 and T4, no isolates of Escherichia and Arcobacter presented antimicrobial resistance to the drugs under study, as well as T5 (10 µg) to which the two bacteria under study were fully susceptible.

Keywords: *Arcobacter spp*, *Escherichia spp*, PCR, Cheese, Meat, Water, Streptomycin, Ciprofloxacin.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CONTENIDO

PAG.

I. INTRODUCCION..... 1

II. PROBLEMA..... 3

III. MARCO TEÓRICO..... 5

3.1. Enfermedades Transmitidas Por Alimentos (Eta)..... 5

3.1.1. Generalidades..... 5

3.1.2. Clases de Microorganismos..... 5

3.1.3. Microorganismos patógenos emergentes transmisibles por los alimentos..... 8

3.1.4. Transmisión horizontal de factores de virulencia y de resistencias antimicrobianas..... 8

3.1.5. Bacterias patógenas emergentes transmisibles por alimentos..... 9

3.2. Género *Arcobacter*..... 10

3.2.1. Generalidades..... 10

3.2.2. Antecedentes históricos..... 10

3.2.3. Taxonomía de *Arcobacter*..... 11

3.2.4 Trasmisión y enfermedades..... 11

3.2.5. Distribución..... 12

3.2.6. Contaminación en alimentos..... 13

3.2.7. Importancia clínica y prevalencia de *Arcobacter* en humanos..... 13

3.2.8. Resistencia a antibióticos..... 14

3.3. Género *Escherichia*..... 15

3.3.1. Generalidades..... 15

3.3.2. Antecedentes históricos..... 15

3.3.3. Taxonomía de *Escherichia spp*..... 16

3.3.4 Trasmisión y enfermedades..... 16

3.3.5. Contaminación en alimentos..... 17

3.3.6. Importancia clínica y prevalencia de *Escherichia spp* en humanos..... 17

3.3.7. Resistencia a antibióticos..... 18

3.3.8. Aislamiento y detección de los géneros *Arcobacter* y *Escherichia*..... 18

3.4. Quinolonas..... 19

3.4.1. Clasificación Quinolonas..... 19

3.4.2. Conceptos Generales..... 19

3.4.3. Mecanismo de acción y Resistencia Bacteriana..... 20

3.4.4. Espectro..... 21

3.4.5. Farmacocinética..... 22

3.4.6. Toxicidad..... 23

3.4.7. Excreción..... 25

3.4.8. Indicaciones terapeúticas..... 25

3.4.9. Ciprofloxacina..... 25

3.5. Aminoglucósidos..... 26

3.5.1. Clasificación de los Animoglucósidos..... 26

3.5.2. Introducción..... 27

3.5.3. Mecanismo de acción..... 27

3.5.4. Absorción..... 28

3.5.5. Distribución..... 29

3.5.6. Excreción..... 30

3.5.7. Toxicidad..... 31

3.5.8. Residuos..... 33

3.5.9. Estreptomicina y Dihidroestreptomicina..... 34

3.5.9.1. Farmacodinámica..... 35

3.5.9.2. Farmacocinética..... 35

3.5.9.3. Usos..... 35

IV. MARCO METODOLÓGICO..... 37

4.1. Materiales..... 37

4.1.1. Ubicación de la investigación..... 37

4.1.2. Localización de la investigación..... 37

4.1.3. Material experimental..... 37

4.1.4. Material de campo..... 38

4.1.7. Materiales de oficina..... 39

4.2. Métodos..... 39

4.2.1. Tipo de diseño..... 39

4.2.2. Factor en estudio..... 39

4.2.3. Tratamientos..... 41

4.2.4. Característica del experimento..... 41

4.2.5. Análisis de varianza ADEVA..... 42

4.2.6. Manejo del experimento..... 42

4.2.6.1. Obtención de aislados bacterianos..... 42

4.2.6.2. Reanimación bacteriana..... 42

4.2.6.3. Análisis molecular de *Escherichia y Arcobacter*..... 43

4.2.6.4. Preparación del inóculo y aplicación de los discos..... 46

4.2.6.5. Análisis de la sensibilidad antibiótica..... 47

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 48

5.1 *Arcobacter spp*..... 48

5.1.1. Reanimación de *Arcobacter* en muestras de quesos..... 48

5.1.2 Extracción, concentración y calidad del ADN extraída *Arcobacter*..... 48

5.1.3 Análisis molecular para *Arcobacter*..... 50

5.1.3.1 Detección de *Arcobacter* por el método de PCR (Polymerase Chain Reaction)..... 50

5.1.4 Análisis actividad Antimicrobiana de Estreptomicina y Ciprofloxacina sobre los tratamientos *Arcobacter*..... 52

5.1.4.1. Efecto de la actividad antimicrobiana de Estreptomicina sobre bacterias del genero *Arcobacter* en estudio (Quesos)..... 52

5.1.4.2. Efecto de la actividad antimicrobiana de Ciprofloxacina sobre bacterias del genero *Arcobacter* en estudio (Quesos)..... 54

5.1.5. Análisis de la actividad antimicrobiana de Estreptomicina y Ciprofloxacina sobre bacterias del género *Arcobacter* obtenidas a partir de muestras de quesos frescos..... 56

5.2. Escherichia..... 60

5.2.1 Reanimación de *Escherichia* en muestras de carne y agua..... 60

5.2.2 Extracción, concentración y calidad del ADN extraída *Escherichia*..... 61

5.2.3 Análisis molecular para *Escherichia*..... 62

5.2.3.1 Detección de *Escherichia* por el método de PCR (Polymerase Chain Reaction)..... 62

5.2.4 Análisis actividad Antimicrobiana de Estreptomicina y Ciprofloxacina sobre los tratamientos *Escherichia*..... 63

5.2.4.1. Efecto de la actividad de Estreptomicina sobre bacterias del genero *Escherichia* (Carne) en estudio..... 64

5.2.4.2. Efecto de la actividad de Ciprofloxacina sobre bacterias del genero *Escherichia* (Carne) en estudio..... 66

5.2.4.3. Efecto de la actividad de Estreptomicina sobre bacterias del genero *Escherichia* (Agua) en estudio..... 68

5.2.4.4. Efecto de la actividad de Ciprofloxacina sobre bacterias del genero *Escherichia* (Agua) en estudio..... 70

5.2.5. Análisis de la actividad antimicrobiana de Estreptomicina sobre bacterias del género *Escherichia* obtenidas a partir de muestras de carne y agua..... 72

5.2.5.1. Análisis de la actividad antimicrobiana de Ciprofloxacina sobre bacterias del género *Escherichia* obtenidas a partir de muestras de carne y agua..... 76

VI. COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS..... 80

VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... 81

7.1 Conclusiones..... 81

7.2. Recomendaciones..... 82

BIBLIOGRAFÍA..... 83

LISTA DE TABLAS

Tabla N°	Descripción	Pág.
1	Taxonomía del Genero *Arcobacter*…….....	11
2	Taxonomía de *Escherichia* spp……...….	16
3	Localización de la investigación…….….....	37
4	Materiales de campo…….…...	38
5	Materiales de oficina…….....	38
6	Descripción de factores para el cultivo de *Escherichia* spp....	40
7	Descripción de factores para el cultivo de *Arcobacter* spp.....	40
8	Tratamientos.....	41
9	Características del experimento.....	41
10	Análisis de varianza (ADEVA).....	42
11	Aislados obtenidos de muestras de agua y productos de origen animal.....	42
12	Reactivos a utilizar PCR.....	44
13	Condiciones para la PCR.....	44
14	Reactivos a utilizar PCR.....	45
15	Condiciones para la PCR.....	45
16	Muestras de *Arcobacter* extraído de quesos.....	48
17	Distribución de tratamientos propuestos según las muestras *Arcobacter* extraído de quesos.....	49
18	Distribución de tratamientos propuestos y su respectivo análisis molecular para muestras de quesos.....	50

19	Tabla de frecuencias y porcentajes para casos positivos de PCR.....	51
20	Análisis de varianza (ANOVA) del efecto de la actividad de Estreptomicina sobre bacterias del genero *Arcobacter* (Quesos) en estudio.....	52
21	Prueba de comparación de medias (Tukey) del efecto de la actividad de Estreptomicina sobre bacterias del genero *Arcobacter* (Quesos) en estudio.....	53
22	Análisis de varianza (ANOVA) del efecto de la actividad de Ciprofloxacina sobre bacterias del género *Arcobacter* (Quesos) en estudio.....	54
23	Prueba de comparación de medias (Tukey) del efecto de la actividad de Estreptomicina sobre bacterias del genero *Arcobacter* (Quesos) en estudio.....	55
24	Concentración mínima inhibitoria de la susceptibilidad de *Arcobacter*.....	56
25	Tabla de actividad antimicrobiana de Estreptomicina frente a aislados de *Arcobacter spp*.....	57
26	Tabla de frecuencias y porcentajes acerca de la susceptibilidad antimicrobiana de Estreptomicina y Ciprofloxacina frente a bacterias del género *Arcobacter spp*.....	59
27	Muestras de *Arcobacter* extraído de quesos.....	60
28	Distribución de tratamientos propuestos según las muestras de *Escherichia* extraído de carne y agua.....	61
29	Distribución de tratamientos propuestos y su respectivo análisis molecular para muestras de carne y agua.....	62

30	Tabla de frecuencias y porcentajes para casos positivos de PCR.....	63
31	Análisis de varianza (ANOVA) del efecto de la actividad de Estreptomicina sobre bacterias del genero *Escherichia* (Carne) en estudio.....	64
32	Prueba de comparación de medias (Tukey) del efecto de la actividad de Estreptomicina sobre bacterias del genero *Escherichia* (Carne) en estudio.....	65
33	Análisis de varianza (ANOVA) del efecto de la actividad de Ciprofloxacina sobre bacterias del genero *Escherichia* (Carne) en estudio.....	66
34	Prueba de comparación de medias (Tukey) del efecto de la actividad de Ciprofloxacina sobre bacterias del genero *Escherichia* (Carne) en estudio.....	67
35	Análisis de varianza (ANOVA) del efecto de la actividad de Estreptomicina sobre bacterias del genero *Escherichia* (Agua) en estudio.....	68
36	Prueba de comparación de medias (Tukey) del efecto de la actividad de Estreptomicina sobre bacterias del género *Escherichia* (Agua) en estudio.....	69
37	Análisis de varianza (ANOVA) del efecto de la actividad de Ciprofloxacina sobre bacterias del genero *Escherichia* (Agua) en estudio.....	70
38	Prueba de comparación de medias (Tukey) del efecto de la actividad de Ciprofloxacina sobre bacterias del género *Escherichia* (Agua) en estudio.....	71
39	Concentración mínima inhibitoria de la susceptibilidad del	72

género *Escherichia* spp frente a Estreptomicina.....

40	Tabla de actividad antimicrobiana de Estreptomicina frente a aislados de *Escherichia* spp.....	72
41	Tabla de frecuencias y porcentajes acerca de la susceptibilidad antimicrobiana de Estreptomicina frente a bacterias del género *Escherichia* spp.....	75
42	Concentración mínima inhibitoria de la susceptibilidad del género *Escherichia* spp frente a Ciprofloxacina.....	76
43	Tabla de actividad antimicrobiana de Ciprofloxacina frente a aislados de *Escherichia* spp.....	76
44	Tabla de frecuencias y porcentajes acerca de la susceptibilidad antimicrobiana de Ciprofloxacina frente a bacterias del género *Escherichia* spp.....	78
45	Tabla de prueba de Hipótesis Chi- cuadrado.....	80

LISTA DE FIGURAS

Figuras N°	Descripción	Pág.
1	Electroforesis con gel de agarosa de aislados de *Arcobacter*.....	50
2	Electroforesis de los resultados del PCR de aislados de *Arcobacter* spp.....	51
3	Efecto de la actividad de Estreptomicina sobre bacterias del genero *Arcobacter* (Quesos) en estudio.....	54
4	Efecto de la actividad de Ciprofloxacina sobre bacterias del genero *Arcobacter* (Quesos) en estudio.....	56
5	Susceptibilidad antimicrobiana de Estreptomicina y Ciprofloxacina frente a bacterias del género *Arcobacter* spp.	60
6	Electroforesis de aislados de *Escherichia* con gel de Agarosa.....	62
7	Electroforesis de los resultados del PCR de aislados de *Escherichia* spp.....	63
8	Efecto de la actividad de Estreptomicina sobre bacterias del genero *Escherichia* (Carne) en estudio.....	65
9	Efecto de la actividad de Ciprofloxacina sobre bacterias del genero *Escherichia* (Carne) en estudio.....	67
10	Efecto de la actividad de Estreptomicina sobre bacterias del genero *Escherichia* (Agua) en estudio.....	70
11	Efecto de la actividad de Ciprofloxacina sobre bacterias del genero *Escherichia* (Agua) en estudio.....	72
12	Susceptibilidad antimicrobiana de Estreptomicina frente a	75

bacterias del género *Escherichia* spp.....

13 Susceptibilidad antimicrobiana de Ciprofloxacina frente a bacterias del género *Escherichia* spp..... 79

I. INTRODUCCIÓN.

La calidad nutricional y la inocuidad de los alimentos son factores importantes que repercuten en la salud y la calidad de vida de las personas. Para velar por la inocuidad de los alimentos en todos los países, desarrollados o en desarrollo, es necesaria la aplicación de ciertas técnicas y normas a fin de, entre otras cosas, prevenir la transmisión de enfermedades de origen alimentario. (FAO, 2017)

En la actualidad se ha identificado un gran número de enfermedades emergentes que afectan al consumidor, la mayoría son de etiología infecciosa y en gran parte son de origen zoonótico, la especie *Arcobacter* requiere de especial interés y está considerada como patógeno emergente, su principal fuente de contagio son alimentos de origen animal que no hayan sido adecuadamente tratados. (Ulloa, 2016)

La infección con *Arcobacter* puede ocurrir por contaminación cruzada mediante la manipulación de alimentos, el consumo de alimentos de origen animal, el consumo de agua contaminada o la contaminación directa con materia fecal, tanto animal como humana, así como por contacto con el individuo enfermo o reservorios animales (Fernández *et al*., 2015)

Escherichia spp. es responsable de toxiinfecciones alimentarias generadas a partir del consumo de productos cárnicos contaminados, definiendo éstas como la ocurrencia de dos o más casos de una enfermedad similar producida por la ingestión de un alimento común. *Escherichia coli* pertenece a la flora normal del intestino humano, de ésta se conocen hasta el momento seis serotipos que pueden ser patógenos y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea, síndrome urémico hemolítico, colitis hemorrágica y cuadros de disentería. (Ferreira *et al.,* 2013)

Así que como objetivo para esta investigación nos hemos propuesto; Estudiar la actividad antimicrobiana de Ciprofloxacina y Estreptomicina en los géneros *Escherichia* y *Arcobacter* aisladas de agua y alimentos de origen animal,

reanimar las cepas de *Escherichia* y *Arcobacter* para su respectivo estudio, realizar un análisis molecular de las cepas en estudio mediante PCR (Polymerase Chain Reaction), estudiar la actividad antimicrobiana de Ciprofloxacina y Estreptomicina mediante la técnica Kirby-Bauer (difusión disco-placa) y al como último, analizar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los antibióticos en estudio.

II. PROBLEMA.

En los países subdesarrollados, las enfermedades de transmisión alimentaria (ETAs) son la principal causa de morbimortalidad, de manera que constituyen un creciente problema de salud pública en todo el mundo. A nivel global, se han descrito alrededor de 250 agentes causantes de ETAs, entre los que se encuentran bacterias, virus, hongos, parásitos, priones y toxinas. Algunos de estos muestran gran incidencia, como *E. coli, Salmonella spp, Arcobacter spp, Listeria monocytogenes* y algunas especies de hongos, entre otros, que están presentes en diferentes tipos de alimentos de la canasta básica, especialmente en aquellos de producción artesanal. (Ruiz *et al*, 2017)

El uso irracional de antibióticos es un problema de salud pública, pues contribuye al desarrollo de resistencias bacterianas, lo cual reduce la efectividad de tratamientos establecidos e incrementa los gastos y la morbilidad por enfermedades infecciosas; la causa principal de la resistencia bacteriana es el uso de los antimicrobianos donde la combinación y el uso excesivo que se observa es evidente, especialmente en los casos de infecciones sin importancia, el uso incorrecto por falta de acceso a tratamiento apropiado y el abandono del tratamiento debido a la falta de recursos financieros son otras de las principales causas. (OMS, 2015)

El queso puede ser elaborado de manera industrial y artesanal, existiendo mayor riesgo de contaminación en la artesanal debido a la falta de implementación de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) durante el proceso de fabricación, pues su composición, nutrientes, valores de actividad de agua, pH, condiciones higiénico–locativas para la elaboración, traslado, conservación y expedición, lo convierten en un potencial medio de transmisión de microorganismos patógenos de alto riesgo en salud pública. (Montealegre, 2017)

A menudo, la transmisión de enfermedades mediante la carne puede ser evitada con el buen cocinado de la misma. Normalmente las intoxicaciones por estos productos son debidas a un consumo inadecuando de la carne cruda,

insuficientemente cocido o por la posterior contaminación del producto cocinado debido a las malas condiciones higiénicas y de mantenimiento. (Lara, 2014)

Así también, es uno de los medios de contaminación más frecuentes para el ser humano, la presencia o aumento de bacterias, parásitos, virus y hongos en el agua surge, por efecto directo o indirecto de cambios en el medio ambiente y en la población tales como urbanización no controlada, crecimiento industrial, pobreza, ocupación de regiones antes deshabitadas, y la disposición inadecuada de excretas humanas y animales. (Ríos *et al.*, 2017).

III. MARCO TEORICO.

3.1. ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (ETA)

3.1.1. Generalidades.

Las ETA son aquellas enfermedades que se originan por la ingestión de alimentos infectados con contaminantes en cantidades suficientes para afectar la salud del consumidor. Existen numerosos tipos de ETA que presentan diferentes sintomatologías, dependientes del tipo de contaminación y de la cantidad de alimento contaminado consumido. Los signos más comunes son vómitos y diarreas, pero también pueden presentarse dolores abdominales, dolor de cabeza, fiebre, síntomas neurológicos, visión doble y otros. Además, ciertas ETA pueden generar enfermedades crónicas a largo plazo tales como daños renales, artritis, meningitis, aborto y, en casos extremos, la muerte (Luz y Proy, 2017).

La contaminación alimentaria estudia aquellos factores que, incidiendo sobre alimentos y bebidas, provocan alteraciones o situaciones de peligro en el hombre tras el consumo de estos últimos. Dependiendo del factor causante de la contaminación se distinguen clásicamente dos tipos de contaminación: la contaminación biótica, provocada por la presencia inoportuna de microorganismos, parásitos, virus y/o productos tóxicos de origen biológico en los alimentos, y la contaminación abiótica, constituida por la presencia de productos químicos o residuos de los mismos, así como de contaminantes de naturaleza radioactiva. (Campos, 2014)

3.1.2. Clases de Microorganismos.

Las bacterias aerobias mesófilas (BAM), son la flora total contenida en el alimento analizado. La determinación de estos microorganismos puede aportar una idea acerca de la calidad sanitaria y calidad higiénica de la materia prima y de cómo ésta ha sido manipulada a lo largo del proceso productivo (Alfaro *et al.*, 2014).

Tomando en cuenta ciertas características tales como la inmunidad, la resistencia, la temperatura y el grado de riesgo que estos organismos presenten, los microorganismos pueden tener otras formas de clasificación.

a) De acuerdo a su resistencia: Se clasifica a los microorganismos de acuerdo a la capacidad que posean para resistir a la actividad de germicidas y ciertos elementos de desinfección.

• Microorganismos de menor resistencia: Entre las bacterias se encuentran la *Salmonella, Erisipelotrix, Brucella, Pasteurella, E. Coli*; de los virus la peste porcina clásica, diarrea viral bovina, rabia, anemia infecciosa y de los hongos son *Trichophyton y Microsporum.*

• Microorganismos de mayor resistencia: Entre las bacterias se encuentran los *Staphylococcus, Leptospira* y los *Streptococcus;* de los virus la fiebre aftosa, lengua azul, estomatitis vesicular, diversos adenovirus y de los hongos la *Candida* spp.

• Micobacterias patógenas atípicas: Entre las bacterias se *encuentran M. tuberculosis, M. bovis, M. avium.*

• Microorganismos esporulantes: como el *Clostridium haemolitucum, Clostridium chauvoei* y *Clostridium tetani.*

b) De acuerdo a su respuesta inmunitaria

Clasifica a los microorganismos desde un punto de vista inmunológico de acuerdo al espacio que ocupan dentro de la célula huésped.

• Microorganismos extracelulares: Algunos microorganismos utilizan este medio para proliferar como las bacterias y los hongos, otros lo utilizan para infectar a otras células como es el caso de los virus.

• Microorganismos intracelulares: La mayor parte de su vida se encuentran dentro de una célula, dejan la célula huésped para infectar a otra (Lennette *et al.*, 2015).

c) De acuerdo a su riesgo: Esta clasificación mide el grado de riesgo que presentan los microorganismos, y es utilizada en laboratorios para la bioseguridad.

• Grupo de riesgo I: Este grupo incluye microorganismos que no son causantes de enfermedades ni en el personal del laboratorio ni en los animales.

• Grupo de riesgo II: Incluyen microorganismos que pueden ser causantes de enfermedades moderadas en el personal de laboratorio y animales, los tratamientos para estas enfermedades suelen ser bastante efectivos. El riesgo comunitario es limitado.

• Grupo de riesgo III: Este grupo incluye microorganismos capaces de producir serias enfermedades en humanos y animales, el tratamiento de estas enfermedades es a base de antimicrobianos y antiparasitarios. El riesgo comunitario es limitado.

• Grupo de riesgo IV: Incluye microorganismos causantes de enfermedades muy serias en humanos y animales, que en algunos casos no tienen tratamiento, el riesgo comunitario es alto (Lennette *et al.*, 2015).

d) Clasificación de los microorganismos según la temperatura: Los microorganismos tienen temperaturas cardinales distintas de acuerdo a esto se clasifican en tres principales grupos:

• Microorganismos psicrófilos: denominados también criófilas, se dividen en dos clases:

- Psicrófilas obligados: con una temperatura que varía de 15 a 18°C. A esta clase pertenece la *Flavobacterium.*

- Psicrófilas facultativas: tienen una temperatura que varía de los 20 a 30°C, pudiendo llegar a los 35°C. Estos microorganismos son causantes de la descomposición de los alimentos guardados en ambientes muy fríos como la heladera (Ekman, 2014).

- Microorganismos mesófilos: Presentan una temperatura que varía de los 35 a 47°C, a este grupo corresponden la mayoría de las *Eubacterias.*

- Microorganismos termófilos: Su temperatura varía de 50 a 75°C, algunos pueden llegar a los 113°C, denominadas termófilas extremas, este grupo está formado exclusivamente por procariotas (Tortora, 2016).

3.1.3. Microorganismos patógenos emergentes transmisibles por los alimentos

Un amplio número de microorganismos patógenos (bacterias, virus y parásitos) se han transmitido de los alimentos al hombre durante miles de años. También durante las últimas décadas se ha reconocido la existencia de microorganismos patógenos emergentes de los alimentos (MPEA) responsables de enfermedades en las personas. Actualmente, como MPEA se consideran los responsables de enfermedades cuya incidencia en las personas ha aumentado durante las dos últimas décadas o que podrían incrementarse en un futuro próximo, así como los responsables de nuevas enfermedades o de enfermedades que se manifiestan con signos clínicos diferentes (Lindsay, 2017).

Muchas bacterias patógenas emergentes transmisibles por los alimentos (BPEA) derivan de la adquisición de genes que codifican factores de virulencia y de resistencias a antibióticos y otros antimicrobianos, lo que incrementa su patogenicidad y capacidad de eludir los tratamientos profilácticos y terapéuticos para reducir su presencia en los animales, alimentos y personas (Lloyd *et al.*, 2019).

3.1.4. Transmisión horizontal de factores de virulencia y de resistencias antimicrobianas

Las bacterias, de las que conocemos su existencia desde hace unos 3.000 millones años, representan las formas de vida más antiguas conocidas, lo que da fe de su enorme poder adaptativo y evolutivo. La virulencia de las bacterias depende de funciones codificadas en su genoma, de mecanismos de regulación inducidos por

las condiciones del medio de desarrollo, y por la inmunidad del hospedador (Freeman y Holland, 2017).

En los procariotas, otros factores determinan su tasa de evolución como las mutaciones puntuales, la recombinación genética, y la transferencia de material genético entre diferentes especies e incluso géneros bacterianos.

Los esfuerzos realizados en la secuenciación genómica de numerosas bacterias han demostrado que, además de los genes que codifican funciones metabólicas esenciales la mayoría de genomas bacterianos poseen genes adquiridos por mecanismos de transmisión horizontal (TGH) que codifican otras funciones bacterianas reguladas bajo determinadas condiciones de desarrollo y ambientales

También se conoce que algunas bacterias patógenas emergentes transmisibles por alimentos (BPEA) han evolucionado como un grupo bacteriano especializado en el secuestro de funciones propias de las células eucariotas y de modificación de sus rutas metabólicas, lo que facilita su supervivencia extracelular e intracelular y evasión del sistema inmune del hospedador (Fraser y Proft, 2018).

3.1.5. Bacterias patógenas emergentes transmisibles por alimentos.

Escherichia es un microorganismo comensal del tracto gastrointestinal de animales y personas. Sin embargo, es de todos conocido que por mecanismos de transmisión horizontal de factores de virulencia (TGH) determinados clones de *E. coli* adquieren genes que les permiten adaptarse a nuevos nichos ecológicos y originar infecciones. Diversas combinaciones de genes que codifican factores de virulencia han originado tipos patógenos de *E. coli* responsables de infecciones en animales y personas (Mainil y Daube, 2015).

Algunas especies como *A. butzleri, A. cryaerophilus, A. skirrowii y A. cibarius* se han aislado de heces de personas sanas y con síntomas clínicos de diarrea y dolor abdominal con bacteriemias asociadas, lo que sugiere que no son meras comensales. Ello hace que las *Arcobacter* spp. citadas se consideren como BPEA

cuya transmisión ocurre por el consumo de agua y alimentos contaminados (Ho *et al.*, 2016).

3.2. Género *Arcobacter.*

3.2.1. Generalidades.

En 1991, el género *Arcobacter* se incluyó en la familia C*ampilobacteriaceae* de la división *epsilon* de las *Proteobacterias* y, actualmente, comprende siete especies aisladas de numerosos reservorios acuáticos, animales, y alimentos de origen animal. Es posible que la incidencia y prevalencia de infecciones humanas por *Arcobacter* spp. se haya minusvalorado por la ineficacia de las técnicas de detección y por su estrategia de adoptar estados viables pro no cultivables (Miller *et al.*, 2017).

Asimismo, la secuenciación del genoma completo de *A. butzleri* RM4018 ha identificado la ausencia de rutas metabólicas frecuentes en otras bacterias, la presencia de genes que codifican LOS/LPS específicos, y la ausencia de enzimas de restricción, lo que facilitaría la TGH de factores de virulencia y la plasticidad de su genoma para su adaptación a otros hospedadores y para incorporar otros mecanismos de patogenicidad. Por ello, conviene evaluar mejor las características fisiológicas y genéticas de un grupo bacteriano que parece constituir un enlace entre el medio ambiente, saprofitismo y patogenicidad en hospedadores animales y humanos (Ho *et al.*, 2016).

3.2.2. Antecedentes históricos.

Siempre ha resultado difícil encuadrar taxonómicamente al género *Arcobacter* debido a sus exigencias de crecimiento y la relativa inactividad en las pruebas bioquímicas convencionales. El género *Arcobacter* fue propuesto por Vandamme (1991), tras un estudio de hibridación ADN del gen 23S del ARNr para describir dos especies aerotolerantes de campilobacterias: *Campylobacter cryaerophila* (actualmente *Arcobacter cryaerophilus*) y *Campylobacter nitrofigilis* (actualmente *Arcobacter nitrofigilis*), que son capaces de crecer a 15ºC. En 1991 se aceptó la creación de una nueva familia, Campylobacteraceae, propuesta por

Vandamme y De Ley (1991) para agrupar los géneros *Campylobacter* y *Arcobacter* (Figueras *et al.*, 2014).

Este agrupamiento se hizo basándose en los caracteres fenotípicos y genotípicos que tenían en común y que a su vez los separaba de otros géneros. Más tarde se incluyeron también las especies *A. butzleri* y *A. skirrowii* (Vandamme *et al*., 1992). Posteriormente, *A. cibarius* aislado de carcasas de pollo (Houf *et al*., 2014) y *A. halophilus* aislado de agua procedentes de un lago hipersalino del noroeste de las islas de Hawai (Collado y Figueras, 2014).

3.2.3. Taxonomía de *Arcobacter.*

Tabla 1.
Taxonomía del Género Arcobacter

Dominio	**Bacteria**
Phylum BXII	*Proteobacteria*
Clase V	*Epsilonproteobacteria*
Orden I	*Campylobacterales*
Familia I	*Campylobacteraceae*
Género I	*Arcobacter*
Género II	*Campylobacter*
Género III	*Sulfurospirillum*

Fuente: Miller *et al.* (2017)

3.2.4 Trasmisión y enfermedades

Las colonias de *Arcobacter* usualmente carecen de pigmentos, todas las especies tienen actividad oxidasa, presentan reacción negativa con el rojo de metilo y con el Voges-Proskauer, no producen indol, excepto *A. mytili* y *A. molluscorum*. La mayoría de las especies reducen nitratos y no hidrolizan el hipurato. Son quimio organotróficas y utilizan una gran variedad de fuentes de carbono como ácidos orgánicos y aminoácidos.

Dentro de sus características y por las cuales se diferencia del género *Campylobacter* se encuentra el que puede crecer en un rango de temperaturas que oscila entre los 15 - 42°C, en condiciones aerobias o anaerobias. Sin embargo, el crecimiento óptimo en el primo aislamiento ocurre bajo condiciones de microaerofilia (3-10 % O2) y no requiere hidrógeno para su crecimiento. Su Tm(e), o temperatura a la cual un 50% del ADN-ARNr híbrido es desnaturalizado es, en promedio, de 66 ºC y poseen un contenido G + C entre un 27% y un 30% mol.

Esta bacteria fue aislada por primera vez a partir de fetos bovinos abortados de manera espontánea en 1977 y posteriormente fue también aislada a partir de fetos de cerdo. La gravedad del cuadro clínico en las infecciones por *Arcobacter* es muy variada. El síntoma principal es la diarrea acuosa persistente, en contraste con la diarrea inflamatoria encontrada en los casos de infección por *Campylobacter jejuni* (Vandenberg *et al.*, 2016).

Las manifestaciones clínicas, sin embargo, pueden ir desde infecciones asintomáticas (Calvo *et al*., 2013) o diarreas leves, hasta diarreas crónicas y abundantes, que exigen hospitalización. En un brote por *A. butzleri* que tuvo lugar en una escuela italiana, que afectó a 10 niños en el año 1992, el síntoma principal fue calambres abdominales recurrentes sin diarrea (Bayas, 2016).

3.2.5. Distribución

El género *Arcobacter* ha sido aislado a partir de ganado vacuno, porcino, ovino, caprino, en pollo y otras aves de corral, como también en fetos de abortos porcinos y bovinos, productos cárnicos, moluscos y leche (Fera *et al.*, 2018).

Algunas especies de *Arcobacter* han sido aisladas en superficies de plantas procesadoras de carne, de agua potable, de alcantarillas, agua de río y de mar. Los miembros de género Arcobacter no son parte de la flora intestinal y el humano se puede infectar por la presencia de este organismo en alimentos de origen animal o en agua, entre otras vías de transmisión que aún no están bien definidas (González y Ferrús, 2015).

3.2.6. Contaminación en alimentos

Los alimentos más comunes son productos derivados de las aves de corral (con la prevalencia más alta) seguida por carne de cerdo, carne de vacuno, y la leche cruda. Aunque todavía no existen muchos estudios, los moluscos son otra fuente potencial de infección por parte de *Arcobarter spp* (Almenar, 2015).

3.2.7. Importancia clínica y prevalencia de *Arcobacter* en humanos

El rol de las especies de *Arcobacter* como causantes de patología humana y animal no ha sido totalmente establecido y sólo tres especies, *A. butzleri, A. cryaerophilus y A. skirowii,* han sido asociadas con padecimientos gastrointestinales, siendo la diarrea el principal síntoma reportado. También se ha observado en varios estudios la existencia de portadores asintomáticos de especies de *Arcobacter* con lo cual aumentan las dudas sobre el potencial patogénico de este género bacteriano (Shah *et al.*, 2014).

La infección con *Arcobacter* puede ocurrir por contaminación cruzada en la manipulación de alimentos, el consumo de alimentos de origen animal contaminados, consumo de agua contaminada o por contaminación directa con materia fecal, tanto animal como humana y se ha postulado la infección por el contacto con humanos infectado. Es posible que en la transmisión hídrica tengan participación amebas de vida libre, como *Acanthamoeba castellanii* con la cual, *A. butzleri* puede establecer endosimbiosis sobreviviendo al interior del protozoo al menos por 10 días (Ho *et al.*, 2016).

La gravedad del cuadro clínico en las infecciones de *Arcobacter* es muy variada, presentándose desde infecciones asintomáticas, diarreas leves, diarreas crónicas y abundantes, hasta casos entéricos graves que ameritan hospitalización, como en el caso de un brote en una escuela en Italia en el año 1992, en el cual diez niños fueron afectados por *A. butzleri,* tres de los cuales fueron hospitalizados, el síntoma principal fue calambres abdominales sin diarrea (Patyal *et al.*, 2014).

La prevalencia de las especies de *Arcobacter* depende de muchos factores propios de la metodología de detección. Existe una carencia de un protocolo oficial y un método de aislamiento que actué como estándar de oro para la identificación de *Arcobacter,* lo cual ha causado que los valores de la prevalencia de los distintos estudios no puedan ser comparados entre sí. Sin embargo, el reporte de casos y prevalencia evidencia que existe un impacto importante por parte de especies de *Arcobacter* en la salud humana y animal (Houf *et al.*, 2014).

Usando métodos de cultivo, la prevalencia reportada de *Arcobacter* en muestras de heces diarreicas en los estudios poblacionales puede variar entre 0,1% en África hasta un 2,4% en Tailandia. Sin embargo, usando métodos moleculares (m-PCR) se encuentra una prevalencia mayor, que oscila entre un 1,2% en Francia hasta un 12,9% en Sudáfrica (Douidah et al., 2015).

Hasta el momento, no se ha establecido de manera clara cuál es el rol que juegan en la infección las características del hospedero, incluyendo edad, sexo y estado inmunológico, pero, al igual que con otros patógenos, se estima que son factores predisponentes, que facilitan o propician la infección. Se plantean que factores como el estado de salud, la hipertensión y el diámetro de la circunferencia del abdomen, son factores predisponentes para la infección por *Arcobacter* y por otros microorganismos similares (Cervenka, 2017).

3.2.8. Resistencia a antibióticos.

La mayoría de los casos de enteritis causada por *Arcobacter* son auto limitadas y no requieren de terapia antimicrobiana, aunque la severidad y prolongación de los síntomas pueden justificar la antibioticoterapia. Para el caso de *Arcobacter* no se han estandarizado los test de susceptibilidad y se han ensayado E-test, dilución en agar, difusión en agar por discos, métodos de micro dilución en caldo, los cuales han revelado que algunas cepas de *A butzleri* son resistentes a la clindamicina, azitromicina, ciprofloxacina, metronidazole, carbenicillina, a la cefoperazona, al cloranfenicol y ampicilina (Houf *et al.*, 2014).

El tratamiento con fluoroquinolonas y tetraciclina se ha propuesto para el tratamiento de las infecciones por *Arcobacter* tanto en animales como en humanos ya que estos presentan una buena actividad contra las cepas de *Arcobacter* (Otth *et al.*, 2014).

3.3. Género *Escherichia*

3.3.1. Generalidades.

Escherichia coli es una bacteria que se encuentra normalmente en el intestino del ser humano y de los animales de sangre caliente. La mayoría de las cepas *de E. coli* son inofensivas. Sin embargo, algunas de ellas, como *E. coli* productora de toxina Shiga, pueden causar graves enfermedades a través de los alimentos. La bacteria se transmite al hombre principalmente por el consumo de alimentos contaminados, como productos de carne picada cruda o poco cocida, leche cruda, y hortalizas y semillas germinadas crudas contaminadas (Brandl, 2016).

E. coli productora de toxina Shiga produce toxinas conocidas como toxinas Shiga por su semejanza con las toxinas producidas por *Shigella dysenteriae. E. coli* productora de toxina Shiga puede crecer a temperaturas que oscilan entre 7°C y 50°C, con una temperatura óptima de 37ºC. Algunas pueden proliferar en alimentos ácidos, hasta a un pH de 4,4, y en alimentos con una actividad de agua (aw) mínima de 0,95 (PEN, 2017).

3.3.2. Antecedentes históricos.

En 1944, Kauffman propuso un esquema para la clasificación de *E. coli* utilizando sueros de conejos inmunizados con las variedades de los antígenos O (somático), H (flagelar) y K (capsular). El antígeno O es un polisacárido termoestable, que forma parte del lipopolisacárido (LPS) presente en la membrana externa de la bacteria. El antígeno K corresponde al polisacárido capsular que envuelve a la bacteria. Actualmente se conocen un total de 185 antígenos somáticos, 56 flagelares y 60 capsulares. La combinación específica de los antígenos O y H define el serotipo de una bacteria, en tanto que la

identificación del antígeno somático hace referencia al serogrupo de la cepa de *E. coli* (Bryan *et al.*, 2015).

3.3.3. Taxonomía de *Escherichia spp*

Tabla 2.
Taxonomía de Escherichia spp

Dominio	Bacteria
Phylum BXII	*Proteobacteria*
Clase V	*Gammaproteobacteria*
Orden I	*Enterobacteriales*
Familia I	*Enterobacteriaceae*
Género I	*Escherichia*

3.3.4 Trasmisión y enfermedades

E. coli (O157:H7) se transmite al hombre principalmente por el consumo de alimentos contaminados, como productos de carne picada cruda o poco cocida y leche cruda. La contaminación fecal del agua y de otros alimentos, así como la contaminación cruzada durante la preparación de estos (con carne de vacuno y otros productos cárnicos, superficies y utensilios de cocina contaminados), también es causa de infecciones. Ejemplos de alimentos implicados en brotes de *E. coli* (O157:H7) son las hamburguesas poco cocidas, el salami curado, la sidra fresca no pasteurizada, el yogur y el queso elaborado con leche cruda (Pen, 2017).

Un número creciente de brotes se asocian al consumo de frutas y verduras (como las coles de Bruselas, las espinacas, la lechuga, las ensaladas de col y de otro tipo) contaminadas por el contacto con las heces de animales domésticos o salvajes en algún momento durante su cultivo o manipulación. También se ha aislado *E. coli* productora de toxina Shiga en masas de agua (estanques y arroyos), pozos y abrevaderos, y se ha observado que puede sobrevivir durante meses en el estiércol y en los sedimentos de recipientes de agua. Se ha informado

de casos de transmisión por el agua, tanto por agua de bebida contaminada como por aguas de recreo.

Los contactos de persona a persona son una forma de transmisión importante por vía oral-fecal. Se ha informado de un estado de portador asintomático, en el que la persona no muestra signos clínicos de la enfermedad, pero puede infectar a otros. La excreción de *E. coli* productora de toxina Shiga dura aproximadamente una semana o menos en los adultos, pero puede prolongarse más en los niños. Se ha observado que otro factor de riesgo importante de infección por *E. coli*. productora de toxina Shiga son las visitas a granjas y otros lugares donde el público en general puede entrar en contacto directo con el ganado (Comisión Del Codex Alimentarius, 2014).

3.3.5. Contaminación en alimentos.

Los alimentos contaminados, en especial la carne de res molida poco cocida, la leche y el jugo sin pasteurizar (crudos), los quesos blandos hechos a partir de leche cruda y las frutas y verduras crudas (como los brotes). El agua contaminada, que incluye beber agua sin tratar y nadar en agua contaminada (Denis *et al.*, 2012).

Los animales y su entorno: en especial, vacas, ovejas y cabras. Si no se lava las manos cuidadosamente después de tocar un animal o su entorno, podría infectarse con *E. coli*, además de Heces de personas infectadas (Vanderberg *et al.*, 2016).

3.3.6. Importancia clínica y prevalencia de *Escherichia* en humanos

Las diferentes cepas de *E. coli* que producen enfermedades se clasifican de acuerdo con el tipo de síntomas que pueden producir en los seres humanos. Estos tipos de cepas se pueden dividir en seis grupos o variedades, a pesar de que las características no son exclusivas y pueden ser compartidas por más de un grupo (variedad). La *E. coli* shigatoxigénica (STEC) es una de estas variedades. Provoca síntomas que van desde una diarrea suave hasta una grave con sangre. En casi el 10% de los pacientes (especialmente niños pequeños y adultos

mayores), la infección puede transformarse en una enfermedad con riesgo vital, como el síndrome hemolítico urémico (SHU) (Hoyde *et al.*, 2014)

Las *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) son un subconjunto de STEC asociadas generalmente a diarrea con sangre y SHU, que producen citotoxinas, conocidas como verotoxinas (VT) o shigatoxinas (Stx). En relación con la salud pública, la cepa de *E. coli* (O157:H7) es el serotipo EHEC más importante ligado a las enfermedades transmitidas por los alimentos, lo que se traduce en una alta incidencia de infecciones y muertes por EHEC cada año (Wang *et al.*, 2016).

3.3.7. Resistencia a antibióticos

La resistencia antibiótica es un problema emergente a nivel mundial presente en diversas bacterias, en especial en la *Escherichia coli,* que tiene altos porcentajes de resistencia hacia ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, cloramfenicol y ácido nalidíxico, lo que supone grandes complicaciones en el tratamiento antibiótico cuando este es requerido (Steinmuller et al., 2016).

Este aumento de resistencia antibiótica se debe a la adquisición de diferentes mecanismos moleculares de resistencia mediante mutaciones puntuales a nivel cromosómico o transferencia horizontal de material genético entre especies relacionadas o diferentes, facilitada por algunos elementos genéticos tales como los integrones (Grauke *et al.,* 2014).

3.3.8. Aislamiento y detección de los géneros *Arcobacter* y *Escherichia.*

El estudio de la prevalencia de las especies *Arcobacter* vinculadas a cuadros clínicos está constantemente entorpecido debido a dos grandes problemas que son: el aislamiento de *Arcobacter* (debido a la inexistencia de medios de cultivos y procedimientos apropiados) y la identificación de las cepas aisladas (Bayas, 2016).

A pesar de que se han utilizado varios medios de cultivo y diversos procedimientos para aislar *Arcobacter* de diferentes tipos de muestras, hasta

ahora no ha sido propuesto un método óptimo para todas las especies del género (Rojas, 2014).

3.4. QUINOLONAS.

3.4.1. Clasificación Quinolonas.

Primera Generación

- Ácido Nalidíxico.
- Ácido Pipemídico.
- Ácido Oxolínico.

Segunda Generación

- Flumequina
- Ciprofloxacina
- Norfloxacina

Tercera Generación

- Enrofloxacina
- Danofloxacina
- Sarafloxacina
- Levofloxacina

Cuarta Generación

- Gatifloxacina
- Moxifloxacino

3.4.2. Conceptos Generales.

Las quinolonas y fluoroquinolonas son el grupo de fármacos sintéticos de más desarrollo en la actualidad. En 1960, Leshner puso a disposición de la comunidad médica el ácido nalidíxico, primera quinolona antibacteriana, que fue rápidamente aceptada para la terapéutica de las infecciones de vías urinarias en

seres humanos. Con el tiempo, se encontró que rápidamente generaba resistencias bacterianas, lo que limitó su uso. Hasta la fecha se han sintetizado más de 10 000 compuestos diferentes a partir del anillo básico de las quinolonas, y actualmente se distinguen tres generaciones de fármacos con potencia antibacteriana y características farmacológicas cada vez mejores. Los compuestos de tercera generación constituyen una esperanza para problemas agudos y crónicos. Dado el gran desarrollo del grupo quinolónico hasta la fecha, pronto aparecerán nuevos miembros de este grupo que serán más potentes y específicos. El núcleo básico de las fluoroquinolonas se muestra en la figura 17-1, donde se señalan los sitios en que es posible añadir algún otro radical para buscar nuevas acciones antibacterianas. Abundan los datos acerca de las manipulaciones de la molécula, de tal suerte que aquí sólo se presentan los resultados resumidos de dichos intentos. A los ácidos nalidíxico, pipemídico, piromídico y oxolínico se les denomina quinolonas de primera generación. Sin embargo, en la mayor parte del mundo sólo se hacen distinciones de tipo químico y de potencia antibacteriana, sin que esto signifique una separación por generaciones. (Álvarez *et al.*, 2015).

3.4.3. Mecanismo de acción y Resistencia Bacteriana.

El sitio de acción de todas las quinolonas y fluoroquinolonas es la girasa de DNA o topoisomerasa II, una enzima esencial para la duplicación del material genético bacteriano. De modo simple, puede decirse que el DNA constituye un material que se encuentra aglomerado y que la función de la girasa de DNA consiste en convertirlo en lineal y girarlo en sentido contrario a la torsión normal de la doble hélice, para así permitir que el material genético se duplique, transcliba, repare y recombine. Las quinolonas interrumpen la unión de la girasa de DNA al material genético. Por todo lo anterior, la inhibición de estos procesos genera el bloqueo de múltiples funciones celulares, muchas de ellas vitales, y de ahí el carácter bactericida de las quinolonas. Es importante señalar que aunque todas las quinolonas tienen efecto sobre la girasa de DNA, cada una tiene variaciones en su forma de actuar. Algunas fluoroquinolonas como la norfloxacina también actúan directamente sobre el DNA. La girasa de DNA o topoisomerasa II es el sitio de unión de las quinolonas y consiste en dos subunidades: GyrA y GyrB. Se cree

que matan a las bacterias debido a un efecto combinado de inhibición metabólica y destrucción del material nuclear e incluso de la girasa de DNA. Las fluoroquinolonas son en su mayoría hasta cuatro veces más potentes como bactericidas a la misma concentración considerada como mínima inhibitoria, lo que las hace especialmente atractivas para el uso clínico. Las Ouoroquinolonas en general y en particular las de tercera generación no se inactivan en presencia de suero, actúan independientemente del tamaño del inóculo y pueden ejercer su efecto antibacteriano a nivel intracelular. Investigaciones recientes sugieren que existe un segundo sitio de unión: la topoisomerasa IV. (Shakti y Rabindra, 2015).

Las fluoroquinolonas de segunda generación se caracterizan fundamentalmente por la presencia de flúor en posición 6 y de piperazina o metil piperazina en posición 7. Siendo la molécula estrella de esta generación el ciprofloxacino y otros miembros representantes son norfloxacino, enrofloxacino, entre otros (Falagas e*t al*., 2017).

3.4.4. Espectro

En general, las quinolonas de primera generación tienen una actividad limitada y un efecto sólo contra algunas bacterias gramnegativas. El espectro aumenta en las de segunda generación, de las cuales la flumequina es la más débil in vitro y carece de efecto sobre micoplasmas. Las otras fluoroquinolonas de segunda generación tienen actividad importante contra PseudcnMnas sp., Chla11l)'dia sp., Mycoplasma sp., Ureaplasma sp., Legionelú:l sp., Pasteurella sp., Haemqphilus sp., Campylobacter sp., Mycobacterium sp. y Staphylococcus sp.; algunos estreptococos han demostrado cierto grado de resistencia. Sin duda las fluoroquinolonas más potentes del grupo son las de tercera generación, que son activas contra todas las bacterias antes mencionadas y contra Bruce[Úl sp., Rickettsia sp., Coxielú:l burnetii y Pla.smodium falciparum, con menor actividad contra Streptococcus sp. y Nocardia sp. y casi nula contra anaerobios. Algunas citas indican que las fluoroquinolonas pueden tener efectos importantes contra Nocardia asteroides. En un estudio la ciprofloxacina fue activa contra 50% de las cepas probadas, y la tosufloxacina (tercera generación) fue 100% eficaz contra esta bacteria. Se ha estimado que para que una fluoroquinolona tenga efecto

clínico importante tiene que lograr una Cpmáx que sea 10-12 veces superior a CMI, o bien que el valor del área bajo la curva (AUC), dividido entre CMI, sea mayor de 125 (AUC/CMI >125). En el cuadro 17-2 se presenta una relación de las CMI aproximadas para estos fármacos con base en lo informado en la bibliografía especializada. En México ya se han usado con éxito varias fluoroquinolonas en el tratamiento de la mastitis, y aunque se han publicado pocos informes, se considera que las fluoroquinolonas de segunda y tercera generaciones son eficaces contra la mayoría de los microorganismos patógenos habituales de esta entidad, con la ventaja de que no interfieren en las defensas orgánicas, lo cual es una caracteristica notable de estos grupos de quinolonas y que no es común de la mayoría de los antibacterianos. Por esta cualidad, se les ha considerado una de las opciones potenciales para desarrollar formas farmacéuticas para el tratamiento de las mastitis crónicas, incluso aquellas causadas por especies de Staphylococcus aureus forma "L" intracelulares. No obstante, por la presencia de posibles metabolitos en la leche que pueden durar tres o cuatro días, no es recomendable indicar quinolonas para tratamiento de la mastitis sino hasta contar con mayores elementos acerca de la persistencia de residuos. (Davis, 2016).

3.4.5. Farmacocinética.

Es esencial que se conozca la farmacocinética de un fármaco antes de usarlo y dar indicaciones para su uso. Curiosamente, en medicina veterinaria sólo hasta fechas recientes se ha iniciado el estudio de las quinolonas de primera generación y apenas hace poco se trató de definir su cinética por VO, incluyendo el ácido pipemídico. Se encontró que su biodisponibilidad fluctúa alrededor de 39%, muy por abajo del 93% encontrado en el ser humano. Además, se sabe que la unión de las quinolonas de primera generación a las proteínas plasmáticas es alta, como el caso del ácido nalidíxico, que en el hombre es de 90%. Éste es un ejemplo más de las limitaciones que se originan al extrapolar datos de una especie a otra. Recientemente y después de la utilización de las quinolonas de segunda y tercera generaciones es cuando se ha iniciado el estudio formal de la farmacocinética de las quinolonas. En el cuadro 1 7-3 se muestra la biodisponibilidad de las

quinolonas después de haberse administrado por vía oral. Ya en el año 1990 se estudió en pollos la cinética de los ácidos oxolínico y piromídico y de flumequina, norfloxacina, enrofloxacina y ciprofloxacina. y se encontró que se pueden absorber bien por el tubo GI. Acerca de dos quinolonas con estructura muy parecida (ciprofloxacina y enrofloxacina), se dice que bajo iguales condiciones experimentales la enrofloxacina logra el doble de las concentraciones plasmáticas y tisulares que la ciprofloxacina, a pesar de que la diferencia entre ambas quínolonas, es solamente de un etilo en la posición 4. Las que se absorben más rápidamente son el ácido piromídico y la ciprofloxacina, y las más lentas son flumequina, ácido oxolínico y enrofloxacina. El alimento puede retardar su absorción. Se han determinado las distribuciones en los diversos tejidos clave. De manera global se asegura que las fluoroquinolonas pueden alcanzar valores terapéuticos en sangre y tejidos con mucha facilidad; sobre todo enrofloxacina y danofloxacina, seguidas de sarafloxacina y flumequina. En 1976 se evaluó en becerros la farmacocinética del ácido oxolínico inyectando por vía IM una dosis de 20 mg/ kg, y se concluyó que se debía inyectar cada 4 h para obtener valores plasmáticos adecuados. Con el surgimiento de las nuevas quinolonas y sus características cinéticas, resulta lógico hacer la consideración de por qué no se ha insistido en adecuar el uso del ácido oxolínico en bovinos. (Bearden Y Danziger, 2011).

3.4.6. Toxicidad

En la actualidad, se sabe poco de la toxicidad potencial de las fluoroquinolonas de segunda y tercera generaciones en animales domésticos productivos como aves, cerdos y bovinos (adultos o jóvenes). Como dato curioso, se necesitan más de cinco frascos de 100 ml de las presentaciones comerciales de enrofloxacina o danofloxacina para inducir efectos tóxicos agudos en un cerdo de 10 kg. Como cualquier otro fármaco pueden producir vómito, n áuseas, diarrea, dolor de cabeza, trastornos visuales, prurito y en casos graves necrosis en el sitio de aplicación. Aunque se ha descrito en animales en crecimiento la inducción de artropatías y alteraciones de la estructura del cartílago articular en forma de erosiones, esto no se ha considerado relevante en animales productivos, como

cerdos, aves y becerros; este problema tiene particular relevancia en cachorros, gatos en crecimiento y potrillos, y es mucho más acentuado en el caso de algunas fluoroquinolonas, como la ciprofloxacina. Debido a que la principal vía de eliminación es por la orina, se ha especulado que las fluoroquinonas pueden inducir un daño u lterior en aquellos riñones ya insuficientes y que se manifiesta con cristaluria, nefritis intersticial y sangre oculta en orina. El daño suele ser leve y sólo ocurre con grandes dosis, nunca usadas en clínica. Ya que la ruta de eliminación de las quinolonas tiene un cometido importante, las quinolonas que se eliminan a través de dos o más mecanismos que no sean la vía renal se pueden utilizar en pacientes que padezcan insuficiencia renal; para quinolonas como esparfloxacina, levofloxacina y gatifloxacina se requiere un ajuste de la dosis en esos pacientes. También se deben de realizar ajustes de dosis en pacientes con insuficiencia hepática cuando se tiene que utilizar grapefloxacina o trovafloxacina. A la fecha sólo se ha detectado en animales retardo en los movimientos y conducta anormal con dosis muy por arriba de lo recomendado. Experimentalmente, se ha demostrado en animales de laboratorio que las convulsiones pueden presentarse por vía de la activación de receptores excitatorios de aminoácidos, posiblemente localizados en la región óptica del SNC y no a través de la interacción con receptores inhibitorios gabaminérgicos, como se había sugerido. La rosoxacina y la perfloxacina inducen opacidad del cristalino después de dosis muy altas durante más de ocho meses, y también se ha informado posible daño testictllar y de la espermatogénesis, pero con dosificaciones absurdamente altas de ácido pipemídico, norfloxacina y perfloxacina, por lo que la relevancia de estos efectos es nula en la clínica. Entre los efectos adversos de las quinolonas oftálmicas se encuentran hiperemia conjuntiva!, mal sabor de boca, fotofobia, edema palpebral, queratitis y náuseas. Quizá sea importante no dosificar a largo plazo y con dosis excesivas a animales gestantes, aunque hasta la fecha no hay informe alguno de teratogenicidad. Se han efectuado pruebas con danofloxacina y enrofloxacina sobre teratogenicidad, embriotoxicidad y mutagenicidad, pero resultan completamente inocuas. En conclusión, las quino lonas son muy poco tóxicas para los animales, en particular en las dosis habituales. Se debe continuar con los ensayos pertinentes para evitar

la especulación comercial y el uso inadecuado de este notable grupo de las quinolonas. (Paredes, 2009).

3.4.7. Excreción

La excreción renal es la vía de eliminación principal de la mayoría de las quinolonas. Las concentraciones urinarias suelen ser elevadas durante las primeras 24 h. tras la administración, y pueden formar cristales en la orina ácida concentrada. La excreción biliar del fármaco original, así como de los conjugados, es una vía importante de eliminación en algunos casos como la ciprofloxacina, la pefloxacina y el ácido nalidíxico. Las quinolonas se detectan en la leche de animales lactantes, a menudo en concentraciones elevadas que persisten durante algún tiempo (Paredes, 2009).

3.4.8. Indicaciones terapéuticas

Las Quinolonas están indicadas en el tratamiento de infecciones locales y sistémicas causadas por microorganismos sensibles, especialmente en infecciones profundas. Se ha logrado éxito terapéutico en infecciones respiratorias, intestinales, urinarias y de la piel, así como en prostatitis bacterianas, meningoencefalitis, osteomielitis y artritis (Bearden y Danziger, 2011).

3.4.9. Ciprofloxacina

Esta es una quinolona de segunda generación de la que se tienen pocos datos de su cinética. Desde una perspectiva veterinaria, la ciprofloxacina es una fluoroquinolona de segunda generación, dado que a pesar de que tiene notable potencia, su farmacocinética es menos favorable que en las de tercera generación. Se ha descrito que en cerdos tiene biodisponibilidad por VO de 37.3%, y de 53% en becerros. En aves, su biodisponibilidad es inferior en 50%. Se une a las proteínas plasmáticas en un 23% en el cerdo y en un 70% en becerros, limitando su eficacia. Es dificil rastrearla, debido a que se pierde en el organismo hasta el 74% de la dosis administrada en becerros y el 53% en cerdos. En cerdos se metaboliza en el hígado hasta el 46% de la dosis administrada y su vida media es de 2-3 h. La eliminación se realiza por vía renal y se especula que también a

través de secreciones intestinales. Por VO se requieren dosis de 20-30 mg/ kg en becerros para lograr CMl adecuadas durante 8 h para Salmonella sp., E. coli y Pasteurella sp. Aparentemente su Vd es bueno cuando se le aplica por vía IV, pero se desconoce si su comportamiento es similar por vía IM. No se cuenta con más datos acerca del metabolito o los metabolitos perdidos. En perros, dosis de 11-33 mg/ kg/ 12 h/ 4 días por VO permitieron lograr valores plasmáticos que mutaron en los extremos de 0.5-5.6 pg/ ml, con T máx de 2 h y con vida media de 5 h; el fármaco se concentró en orina y heces. En estos sitios, así como en tráquea y tejido respiratorio, alcanza concentraciones muy por arriba del valor de las CMI para Protrus mirabilis, E. coli, Khbsiella pneumoniae, Staphylococcus intermedius y Pseudomonas aeruginosa. También se logran concentraciones terapéuticas en próstata y llega a la leche, aunque no se han realizado estudios que validen su uso en mastitis clínicas. En estudios comparativos con enrofloxacina en pollo de engorda, la ciprofloxacina tuvo buen Vd y eliminación rápida.

En cuanto a la actividad de la Ciprofloxacina se ha dicho que es excelente contra las micoplasmas más comunes en veterinaria. Se observó que la Ciprofloxacina no fue capaz de erradicar la brucelosis en animales experimentalmente infectados. Esto no concuerda con el uso clínico que se ha dado a las Fluroquinolonas de tercera generación en él ser humano, lo que quizá se deba a las características farmacocinéticas de la Ciprofloxacina. (Paredes, 2009).

3.5. AMINOGLUCÓSIDOS.

3.5.1. Clasificación de los Aminoglucósidos.

Los miembros más conocidos de esta familia de antibióticos contienen, además de uno o varios aminoazúcares, un aminociclitol (alcohol cíclico con grupos aminos) unidos por un enlace glucosídico, por lo que realmente son aminoglucósidos-aminociclitoles.

A continuación, se describen los miembros con mayor importancia farmacológica:

- Estreptomicina y Dihidroestreptomicina.
- Kanamicina
- Amikacina
- Gentamicina
- Neomicina
- Tobramicina
- Apramicina
- Espectomicina

(Deck y Winston, 2017)

3.5.2. Introducción.

Se presenta un análisis sobre la farmacología clínica de los aminoglucósidos (AG) y se considera un grupo análogo, el de los aminociclitoles (AC). Los aminoglucósidos son una clase de antimicrobianos obtenidos a partir de Streptomyces sp., Micromonospora sp. y Bacillus sp. Son muy solubles en agua y poco solubles en Iípidos. Su peso molecular varía de 400 a 500 Da. Su estructura determina su actividad antimicrobiana, su toxicidad y la resistencia que generan. Los aminoglucósidos son estables químicamente en medios con un amplio espectro de valores de pH y temperatura. Son aminoazúcares policatiónicos que se ionizan en gran proporción en los líquidos corporales. Poseen pKa de 7.2-8.8 y su capacidad de difusión es limitada. (Deck y Winston, 2017).

3.5.3. Mecanismo de acción.

Este se ha explicado en términos de la unión del antibiótico con una proteína receptora en la membrana bacteriana; en el caso de la estreptomicina se sabe que es la PlO. Dicha unión es facilitada por la electropositividad de los aminoglucósidos y por la electronegatividad de la superficie celular. El antibiótico ingresa a la bacteria por transporte activo dependiente de oxígeno y relacionado con el transporte de electrones. Al parecer, esto altera la permeabilidad de la membrana bacteriana, lo que explica el sinergismo antimicrobiano que logran los aminoglucósidos con otros fármacos como los ~lactámicos. Los microorganismos anaerobios no son atacados, debido al tipo de

vía que utilizan los Aminoglucósidos para ingresar a la célula. Dentro del citoplasma bacteriano, se unen de manera irreversible a los receptores proteínicos en la unidad ribosómica de 30S y en mucho menor proporción a la de SOS.

La inducción de resistencias a los Aminoglucósidos y aun a los aminociclitoles es relativamente rápida. Al parecer la resistencia esta mediada por la generación de enzimas inacticvadoras, dependientes de plásmidos y por ende, transmisibles. L a resistencia se manifiesta como una limitación del ingreso de estos microbianos al interior de la bacteria (Rojas, 2014).

3.5.4. Absorción.

Los Aminoglucósidos no se absorben del tubo gastrointestinal en condiciones habituales y, por tanto, por esta Por su condición de cationes altamente polares, los AG se consideran antibióticos sin absorción digestiva. Sólo la neomicina se comercializa en comprimidos orales, pero cerca del 97 % de la dosis administrada escapa y se elimina sin modificaciones por las heces. Se absorben rápidamente por vía parenteral, y alcanzan concentraciones plasmáticas máximas entre 30 y 90 minutos por vía intramuscular y 30 minutos por vía endovenosa. Los Aminoglucósidos no se absorben por el tracto gastrointestinal, de manera que hay que administrarlos por vía parenteral. Por vía intramuscular se absorben totalmente, obteniéndose la concentración máxima (Cmáx) sérica entre 30 y 90 min. Por vía intravenosa se recomienda administrarlos mediante perfusión durante 15-30 min, y si la dosis es elevada (caso de monodosis), el tiempo de perfusión se debe incrementar hasta 30-60 min para evitar la aparición de bloqueo neuromuscular. No se recomienda su administración en las cavidades pleural y peritoneal por la posibilidad de absorción rápida y toxicidad subsiguiente

De su sitio de aplicación, intramuscular o subcutánea, los Aminoglucósidos y los aminociclitoles se absorben de manera rápida y casi completa, llegando a valores pico en 30 min aproximadamente. La biodisponibilidad de Aminoglucósidos y aminociclitoles es por lo menos de 90%. La absorción a través de mucosas es rápida y la vía intraperitoneal es casi tan veloz como la intravenosa. La aplicación

de Aminoglucósidos por vía atópica en heridas, permite la absorción de estos compuestos y su uso por periodos prolongados puede generar toxicidad renal

3.5.5. Distribución.

Dada la ionización de los aminoglucosidos y los aminocitoles, su difusión, fuera del compartimiento sanguíneo, es limitada. Se distribuyen libremente en el espacio vascular y de forma relativamente libre en el líquido intersticial de la mayoría de los tejidos, debido a su escasa unión a proteínas y alto nivel de solubilidad. El volumen de distribución es de 0,2-0,3 l/kg. Atraviesan escasamente las membranas biológicas con la excepción de las células tubulares renales y las del oído interno, que muestran una cinética de captación de aminoglucósidos saturable. Una hora después de su administración, la concentración urinaria es entre 25 y 100 veces superior a la plasmática y se mantiene elevada durante varios días. La administración en aerosol consigue en la secreción bronquial mayor concentración que la administración parenteral. Atraviesan mal la barrera hematoencefálica, de manera que cuando se desea conseguir niveles adecuados en el líquido cefalorraquídeo se recomienda la administración intraventricular o intratecal. En el recién nacido la difusión a través de la barrera hematoencefálica es mejor. Difunden bien al líquido sinovial, consiguiéndose niveles sólo algo menores que los plasmáticos. La inyección subconjuntival proporciona niveles adecuados en el humor acuoso, pero ni la administración parenteral ni la subconjuntival consiguen niveles eficaces en el humor vítreo, por lo que, en caso de endoftalmitis, hay que recurrir a la administración intravítrea.

Los aminoglucósidos no se distribuyen bien cuando tienen que atravesar barreras membranosas, por lo que no se encuentran concentraciones medibles en tejido cerebral o respiratorio, líquidos cerebroespinal u ocular y secreciones, aun administrando gentamicina o amikacina, que tienen mejor distribución. Como la penetración de los aminoglucósidos al tejido pulmonar se describe apenas como intermedia, se ha sugerido que para el tratamiento de infecciones bacterianas a este nivel se aplique el Aminoglucósidos elegido por vía IV, con lo cual se logra

un gradiente de concentración adecuado entre el plasma y el tejido pulmonar y se favorece su penetración. Los sitios en que predomina la acumulación de estos fármacos son corteza renal y oído interno, por lo que pueden dañar las células ciliares y producir sordera. Por su limitada distribución se les ha utilizado con éxito en septicemias producidas por bacterias aerobias gramnegativas.

En contraste con estas observaciones, está el hecho de que se ha considerado poco congruente el uso de Aminoglucósidos para el tratamiento de la mastitis bovina por Escherichia coli dado que la penetración al tejido mamario debe ser insuficiente por su notable ionización. Más aun se ha mostrado que la Gentamicina contenida en liposomas aumenta la destrucción de bacterias intracelulares y es posible que un enfoque similar sea útil en el tratamiento de la mastitis bovina causado por formas "L" de Staphylococcus aureus. De cualquier manera, el uso de Gentamicina debe depender de la distribución y aplicación estricta de los periodos de retiro

3.5.6. Excreción.

Debido a que la mayoría de los aminoglucósidos se encuentran en forma libre y su peso molecular es bajo (400-500 Da), hay una adecuada filtración glomerular, que sólo se encuentra limitada por la atracción de los aminoglucósidos a la electronegatividad de la membrana glomerular. En el filtrado glomerular los aminoglucósidos son captados por las células tubulares con cargas contrarias, forman complejos entre fosfolípidos y el aminoglucósidos y dan lugar a vesículas pinocitósicas que se incorporan a los Hsosomas. Una vez dentro de las células tubulares, el fármaco puede provocar disfunciones en lisosomas, mitocondrias y enzimas y como consecuencia alterar la filtración glomerular. También se encuentran moléculas libres en el citoplasma, lo que da lugar a la acumulación de los aminoglucósidos, aún en contra de gradientes de concentración. Las concentraciones renales pueden ser 100 veces mayores que las del plasma y más en casos de septicemia. Al suspenderse la aplicación del aminoglucósido, se inicia su eliminación lenta con una vida media de por lo menos 30 h, pero puede llegar a ser hasta de 59 días. El 80-85% se excreta por la orina y el resto se fija al

riñón; prácticamente no hay biotransformación. Sólo en los bovinos una pequeña porción se excreta en la bilis. Ya que los riñones son los principales órganos de excreción y acumulación de los aminoglucósidos, el análisis de eliminación se hace directamente en orina.

3.5.7. Toxicidad.

En medicina veterinaria, la principal toxicidad de los aminoglucósidos es la nefrotoxicidad. En particular, la toxicidad se manifiesta en las células tubulares, pero en ocasiones hay daño glomerular. El riñón ofrece una amplia superficie de con tacto por el sistema tubular y es blanco fácil de la toxicidad de los aminoglucósidos, pues recibe 25% del gasto cardiaco. El mecanismo exacto de la toxicidad no es claro, pero se sabe que los aminoglucósidos se unen a fosfolípidos de las membranas celulares, afectando su fluidez y presión, al igual que la estabilidad iónica de la membrana; también se liberan iones Ca2+ que sirven como enlaces para la formación de vesículas en do tóxicas, que se agregan a los lisosomas, donde ocurren depósitos en forma de placas y pérdida de esfingomielina y fosfolipasa A1. Esta alteración es la clave que induce la toxicosis celular a partir de la alteración lisosómica. El daño renal causado por aminoglucósidos tiene un rango que va de ligero, con cambios subclinicos, h asta la más grave nefrotoxicosis, con signos

renales agudos. La capacidad del animal de recuperarse depende del tipo de fármaco al que fue expuesto y del estado del tejido renal con capacidad de recuperarse. La asimilación del aminoglucósido a las células tubulares es un proceso saturable y depende de la carga, por eso la neomicina se acumula más rápido que la gentamicina. La toxicosis renal depende de la concentración de aminoglucósidos, ya que una vez que éstos se encuentran en los tú bulos proximales, interfieren en el metabolismo celular y en e l proceso de transporte. Los cambios en los túbulos renales pueden avanzar hasta causar necrosis, si persiste la exposición al fármaco. La lesión renal se manifiesta como una inflamación difusa y posteriormente hay necrosis del epitelio tubular con insuficiencia renal nefrotóxica, glomerulonefritis, nefritis intersticial, nefrosis y

síndrome nefrótico. Se presentan típicamente cilindruria, proteinuria y hematuria. La diálisis peritoneal puede ser útil para disminuir creatinina, urea y nitritos sanguíneos acumulados por la lesión, pero no es eficaz para eliminar aminoglucósidos acumulados. En algunos pocos casos el daño renal es reversible y el tejido puede regenerarse. Como regla general, la administración de aminoglucósidos se debe suspender cuando existe evidencia de daño renal. Es importante señalar que a menudo los valores de urea y creatinina no son afectados a pesar de que ya se indujo un daño renal considerable. Si es posible, se prefiere determinar las concentraciones de y-glutamiltranspeptidasa, en particular si se conocen los valores basales de la especie. Esta enzima es un indicador de daño renal mucho más sensible. Debe considerarse el uso de antimicrobianos alternativos en animales con insuficiencia renal, y cuando se requiera administrar aminoglucósidos, es más recomendable aumentar el intervalo de dosificación para prevenir la toxicosis que disminuir la dosis. Algunos factores de riesgo para que se produzca daño renal agudo incluyen: acidosis, edad avanzada, diabetes mellitus, infecciones por dirofilaria, desbalances electrolíticos, fiebre, sepsis, disfunciones hepáticas, hipoalbuminemia, hipotensión, septicemia y pielonefritis. No es suficiente ajustar las dosis para evitar la toxicosis; es preferible ajustar el intervalo de dosificación y determinar las concentraciones plasmáticas del antimicrobiano, cuando sea posible. Se grafica la fase de e liminación con dos puntos utilizando papel semilogariunico; el momento en el que se recomienda la redosificación, se calcula por extensión de la recta formada. A este proceso se le denomina en inglés "drug monitoring", y representa la forma más segura de realizar tratamientos prolongados con aminoglucósidos. El tipo de toxicidad depende de la distribución y concentración en cada órgano. La parálisis neuromuscular se considera menos frecuente que la nefrotoxicosis y la ototoxicosis, pero llega a ocurrir en animales debilitados o cuando se aplica posterior a la anestesia, en particular si la administración es por vía intravenosa.

Es posible desarrollar hipersensibilidad a éstos. Existe interferencia de muchos antibióticos con la actividad fagocitica; se ha identificado que los aminoglucósidos pueden disminuirla. A pesar de que no está claro el impacto clínico, se ha demostrado que en bovinos los aminoglucósidos en general suelen

alterar la concentración sanguínea de Ca2+, porque disminuyen su unión a las proteínas plasmáticas. Es entonces razonable suponer que pueden agravar un caso de hipocalcemia.

Aunque se reconoce que existe una interferencia de muchos antibióticos con la actividad fagocitica, en el caso de los Aminoglucósidos se ha identificado su capacidad para disminuirla

3.5.8. Residuos.

Aunque en Estados Unidos y en Canadá, los Aminoglucósidos no están aprobados para su uso en animales destinados a producir alimentos, se les llega a utilizar en vacas de desecho y becerros.

Ya que no existe un antídoto especifico, el tratamiento de la sobredosis con Aminoglucósidos o de las reacciones tóxicas debe ser sintomático y de mantenimiento. Se deben mantener las funciones respiratoria y -renal. La diálisis peritoneal o la hemodiálisis ayuda a eliminar los Aminoglucósidos de la sangre en pacientes con función renal normal. Cuando se administran simultáneamente dos o más Aminoglucósidos se puede producir bloqueo neuromuscular, que da lugar a debilidad de músculo esquelético y a depresión o parálisis respiratoria (apnea) prolongadas.

Para ayudar a revertir el bloqueo se puede utilizar anticolinesterásicos o sales de calcio. También puede ser preciso la asistencia respiratoria mecánica. Cuando se administran simultáneamente con otros agentes ototóxicos o nefrotóxicos se puede necesitar realizar determinaciones auditivas periódicas. Cuando se administran simultáneamente con otros agentes ototóxicos o nefrotóxicos se puede necesitar realizar determinaciones de la función renal y de la concentración sérica, reducir la dosificación o alternar los antibióticos.

A pesar de los largos periodos de retiro, los aminoglucósidos se concentran más en riñón, por lo que tal vez sería conveniente fomentar el decomiso selecti\'O de riñones en ciertos animales. Cuando se administran por vía intramamaria se han

determinado tiempos de retiro que varían entre cuatro y 13 ordeñas para los principales aminoglucósidos, pero se ha sugerido que se realicen pruebas individuales, ya que la eliminación puede ser muy variable y prolongarse durante 30 días.

En Latinoamérica se utilizan estos antimicrobianos en el tratamiento de animales de consumo, por lo que es importante que en varias enfermedades se inicie un estudio detallado de los periodos de eliminación de los aminoglucósidos en diversos tejidos y en leche, conforme a los diferentes esquemas de dosificación.

3.5.9. Estreptomicina y Dihidroestreptomicina.

La Estreptomicina y Dihidroestreptomicina, son antibióticos aislados Fue aislada por Albert Schatz (19 de octubre de 1943) en el laboratorio de Waksman y bajo su supervisión, para la Universidad de Rutgers, Nueva Jersey, en EE. UU. Aunque el trabajo de cribado de antibióticos en la Universidad de Rutgers fue iniciado por Waksman, el trabajo experimental fue en gran medida realizado por estudiantes de doctorado que trabajaban bajo su supervisión. El éxito fue casi inmediato con el descubrimiento primero de actinomicina y luego estreptomicina. Sin embargo, debido a problemas relacionados con la toxicidad, ninguno de estos antibióticos se usó inicialmente en medicina.

La estreptomicina es activa contra micobacterias, gramnegativos, Leptospira sp., Francisella tularensis y Yersinia pestis, pero sólo actúa contra unos pocos micoplasmas y algunas especies de estafilococos.

La estreptomicina fue el primer antibiótico descubierto del grupo de los aminoglucósidos; también fue el primer fármaco de la era de la quimioterapia usado en el tratamiento de la tuberculosis. Es un antibiótico bactericida de espectro pequeño, derivado de la actinobacteria Streptomyces griseus. En su método de acción, realiza una inhibición de la síntesis proteica a nivel de la subunidad 30s del ribosoma.

3.5.9.1. Farmacodinámica.

La estreptomicina muestra un patrón de actividad bactericida que es dependiente de la concentración (ABDC) del antimicrobiano, pero no del tiempo de exposición de las bacterias. Por tanto, el objetivo del tratamiento con aminoglucósidos debe ser incrementar al máximo la Cmáx administrando la dosis más alta posible que permita el límite de toxicidad (Álvarez *et al.*, 2015).

Los estudios clínicos han comprobado que existe una relación directa entre la Cmáx de estreptomicina y la respuesta terapéutica en el tratamiento de la bacteriemia y la neumonía por bacilos gramnegativos y que existe una graduación dosis-respuesta entre el cociente entre concentración máxima y concentración inhibitoria mínima (Cmáx/CIM) y la respuesta clínica (Paredes, 2009).

3.5.9.2. Farmacocinética.

Los aminoglucósidos no se absorben por el tracto gastrointestinal, de manera que hay que administrarlos por vía parenteral. Por vía intramuscular se absorben totalmente, obteniéndose la concentración máxima (Cmáx) sérica entre 30 y 90 min. Por vía intravenosa se recomienda administrarlos mediante perfusión durante 15-30 min, y si la dosis es elevada (caso de monodosis), el tiempo de perfusión se debe incrementar hasta 30-60 min para evitar la aparición de bloqueo neuromuscular. No se recomienda su administración en las cavidades pleural y peritoneal por la posibilidad de absorción rápida y toxicidad subsiguiente (Palomino y Pachón, 2013).

3.5.9.3. Usos.

En el tratamiento de Leptospirosis Bovina, la estreptomicina sigue siendo la primera opción a dosis de 6-12 g/vaca. La estreptomicina está indicada para el tratamiento de diversas formas de tuberculosis producidas por la bacteria *Mycobacterium* tuberculosis. Por lo general se asocia esta sustancia con otros antituberculosos. Otros usos frecuentes son los casos de profilaxis de la

endocarditis bacteriana, de brucelosis y en el granuloma inguinal causado por Donovania granulomatis.

Utilizada como fármaco de primera línea para el tratamiento de la tuberculosis, la dosis estándar se sitúa en el rango de 0,5 a 1 g por día. Se administra por vía intramuscular o intravenosa y suele utilizarse únicamente en combinación con otros fármacos para prevenir el surgimiento de resistencia.

La estreptomicina sigue siendo la primera opción en el tratamiento de la leptospirosis bovina, y la dosis que se recomienda es de 6-2 g/ animal/ día/ no más de tres días por vía IM. Puede ser útil en infecciones por la subespecie Campylobacter fetus veneralis, utilizando una infusión (concenlración de 500 mg/ ml) en dosis de 10 mi/tres días consecutivos en la cavidad prepucial,junto con una dosis de 22 mg/kg por vía se. Se utiliza sola o combinada con penicilina para el tratamiento de fiebre de embarque, onfalitis y pododermatitis. Se menciona que es particularmente eficaz contra Haemophilus sp., Salrnonella sp. y Klebsiella sp. La eficacia de la mezcla oxitetraciclina-estreptomicina para tratar la brucelosis en el ser humano ha hecho de esta combinación el tratamiento de elección para esta patología

IV. MARCO METODOLÓGICO.

4.1. MATERIALES.

4.1.1. Ubicación de la investigación.

La presente investigación se desarrolló en la Universidad Estatal de Bolívar, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Departamento de Investigación, Laboratorio de Biología molecular, perteneciente al Centro de Investigación y Desarrollo Bacteriológico.

4.1.2. Localización de la investigación.

Tabla 3.
Localización de la investigación.

Ubicación	Localidad
Provincia	Bolívar
Cantón	Guaranda
Sector campus	Laguacoto I
Dirección	Vía Guaranda – San Simón Km 1 ½

4.1.3. Material experimental.

- 60 aislados (bacterias obtenidas de muestras de alimentos de origen animal y agua).
    - 20 cepas de muestras de agua.
    - 20 cepas de muestras de quesos.
    - 20 cepas de muestras de carnes.
- Ciprofloxacina.
- Estreptomicina.

4.1.4. Material de campo.

Tabla 4.
Materiales de campo.

Materiales de Campo
Estufa
Material de vidrio y plástico
Pipetas
Balanza digital
Reactivos
Cajas Petri
Asas de siembra
Mechero
Gradillas
Tubos eppendorf
Microtubos eppendorf
Gradillas de eppendorf
Medios de cultivo
Termociclador
Incubadora
Cuenta colonias
Cámara de flujo laminar
Panel de electroforesis
Transuluninador (foto documentador)
Tampones de carga y reacción en gel
Reactivos para PCR
Marcadores de pesos moleculares
Kit de extracción de ADN

Micropipetas
Micropuntas
Agares
Nanodrop
Sangre de Oveja
Agitador vórtex

4.1.7. Materiales de oficina.

Tabla 5.
Materiales de oficina.

Materiales de oficina.
Libreta de apuntes.
Computadora.
Impresora.
Esferográficos.
Cámara fotográfica digital.
Calculadora.

4.2. MÉTODOS.

4.2.1. Tipo de diseño.

Diseño de bloques completamente al azar (DBCA)

4.2.2. Factor en estudio.

Para analizar la concentración mínima inhibitoria de los antibióticos en estudio utilizando distintas concentraciones en dilución de agente antimicrobiano, tuvimos los siguientes factores de estudio.

Tabla 6.

Descripción de factores para el cultivo de Escherichia spp.

Tratamientos	Descripción
0	*Escherichia* aislada en medio de cultivo (Mueller-Hinton) + Disco antibiograma (5µg) (Control)
1	*Escherichia* aislada en medio de cultivo (Mueller-Hinton) + Disco antibiograma (1 µg)
2	*Escherichia* aislada en medio de cultivo (Mueller-Hinton) + Disco antibiograma (2 µg)
3	*Escherichia* aislada en medio de cultivo (Mueller-Hinton) + Disco antibiograma (3 µg)
4	*Escherichia* aislada en medio de cultivo (Mueller-Hinton) + Disco antibiograma (4 µg)
5	*Escherichia* aislada en medio de cultivo (Mueller-Hinton) + Disco antibiograma (10 µg)

Tabla 7.
Descripción de factores para el cultivo de Arcobacter spp.

Tratamientos	Descripción
0	*Arcobacter* aislada en medio de cultivo (Mueller-Hinton) + Disco antibiograma (5 µg) (Control)
1	*Arcobacter* aislada en medio de cultivo (Mueller-Hinton) + Disco antibiograma (1 µg)
2	*Arcobacter* aislada en medio de cultivo (Mueller-Hinton) + Disco antibiograma (2 µg)
3	*Arcobacter* aislada en medio de cultivo (Mueller-Hinton) + Disco antibiograma (3 µg)
4	*Arcobacter* aislada en medio de cultivo (Mueller-Hinton) + Disco antibiograma (4 µg)
5	*Arcobacter* aislada en medio de cultivo (Mueller-Hinton) + Disco antibiograma (10 µg)

4.2.3. Tratamientos.

Tabla 8.
Tratamientos.

Tratamientos	Descripción
T0	Disco de antibiograma (5 µg) + Ciprofloxacina/Estreptomicina (Control)
T1	Disco de antibiograma (1 µg) + Ciprofloxacina/Estreptomicina
T2	Disco de antibiograma (2 µg) + Ciprofloxacina/Estreptomicina
T3	Disco de antibiograma (3µg) + Ciprofloxacina/Estreptomicina
T4	Disco de antibiograma (4 µg) + Ciprofloxacina/Estreptomicina
T5	Disco de antibiograma (10µg) + Ciprofloxacina/Estreptomicina

4.2.4. Característica del experimento.

Tabla 9.
Características del experimento.

Localidad	1
Numero de tratamientos	6
Numero de repeticiones	3
Tamaño de la unidad experimental	100g
Número de muestras por tratamiento	50
Número total de muestras	180

4.2.5. Análisis de varianza ADEVA.

Se utilizó un DBCA, diseño de bloques completamente aleatorizado, según el siguiente esquema de ADEVA.

Tabla 10.
Análisis de varianza (ADEVA)

Fuentes de variación	Grados de libertad
Total (t-r)	17
Tratamientos (t-1)	5
Bloques (repeticiones-1)	2
Error Experimental (t-1) (t-r)	15

4.2.6. Manejo del experimento.

4.2.6.1. Obtención de aislados bacterianos

Se trabajó con patógenos previamente aislados y congelados, los cuales fueron reanimados para su posterior estudio. Las muestras que utilizamos fueron extraídas de alimentos de origen animal (queso y carne) y agua, las cuales fueron asignadas de la siguiente manera.

Tabla 11.
Aislados obtenidos de muestras de agua y productos de origen animal.

Detalle de la muestra.	Número de muestras.
Aislados de Queso	20
Aislados de Carne	20
Aislados de Agua	20

4.2.6.2. Reanimación bacteriana.

Reanimado de aislados de *Arcobacter spp.*

Se seleccionaron 20 aislados de *Arcobacter* obtenidos de muestras de quesos, para lo cual, se prepararon cajas de agar sangre [*Arcobacter* broth (**OXOID, CM0965B, UK**) + Bacto agar + Sangre de cordero 5%]; El reanimado se lo llevó a cabo vertiendo 0,5 mL de cultivo (criovial) sobre las cajas Agar sangre, luego fueron incubados a 37°C durante 24-48 h conforme lo establecido por Vicente-

Martins *et al*. (2017) en condiciones de microaerofília (10 % CO_2, 5 % O_2, y 85 % N_2) (Atabay y Corry, 1997).

Reanimado de aislados de *Escherichia spp.*

Se seleccionaron 40 aislados de *Escherichia* obtenidos de muestras de carne y agua, para lo cual se prepararon cajas de NutriAgar, (**OXOID, CM0003, UK**); El reanimado se lo efectuó, vertiendo 0,5 mL de cultivo (criovial) sobre las cajas Agar nutriente, luego fueron incubados a 37°C durante 24-48 h en condiciones de aerobiosis (López *et al.*, 2019),

4.2.6.3. Análisis molecular de los géneros *Escherichia y Arcobacter*.

El análisis molecular fue realizado mediante la técnica de Polymerase Chain Reaction (PCR). Cada uno de los aislados obtenidos se sometió a extracción de ADN mediante la utilización de un Kit de aislamiento de ADN específico (**Thermo Scientific™, K0502, USA**).

La concentración del ADN se analizó utilizando un micro-espectrofotómetro (Nanodrop) (**Thermo Scientific™**, **ND-ONE-W, USA)** para cumplir el objetivo de realizar un análisis molecular de las cepas de interés (Guamán, 2017).

4.2.6.3.1. Análisis molecular de *Arcobacter spp.*

El ADN producto fue amplificado mediante PCR utilizando un par cebadores que amplifican un fragmento de 1026-pb del gen 16S ARNr, utilizando los iniciadores descritos por Figueras *et al*. (2012), cuyas secuencias se detallan a continuación:

CAH1am: 5'-AACACATGCAAGTCGAACGA-3'

CAH1b: 5'-TTAACCCAACATCTCACGAC-3'

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 50 µL, conteniendo 45 µL de la mezcla y 5 µL de ADN molde, En cada reacción se incluyó como control positivo ADN de la cepa de referencia *Arcobacter butzleri* DSM 8739. Los reactivos a utilizar para PCR y el proceso de amplificación se realizaron siguiendo las condiciones que se describen a continuación.

Tabla 12.
Reactivos a utilizar PCR.

Reactivos	Concentración final
Tampón	1 X
dNTPs	0,2 mM/cada
$MgCl_2$	1,5 mM
Iniciadores	0,5 µM/cada
Taq polimerasa	5 U

Tabla 13.
Condiciones para la PCR.

Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo	Fases
1	94	2 minutos	Desnaturalización inicial
30	94	30 segundos	Desnaturalización
	52	30 segundos	Unión de iniciadores
	72	90 segundos	Extensión
1	72	10 minutos	Extensión

Los productos generados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2%, preparado en tampón TAE 1 X (**INVITROGEN™**, **24710-030, USA**), con la adición de 5 µL de RedSafe (**INVITROGEN™, S33102, USA**), y se sometió a 100 voltios durante 45 minutos. Para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN amplificados se utilizó un marcador de pesos molecular 100pb (**TrackIt® 100-bp DNA Ladder, INVITROGEN™**).

Finalmente, los fragmentos se visualizaron en un transiluminador (fotodocumentador) bajo luz ultravioleta (UV).

4.2.6.3.2. Análisis molecular de *Escherichia* spp.

El ADN producto fue amplificado mediante PCR) utilizando el par cebadores que amplifican un fragmento de 212-pb del gen 16S ARNr, utilizando los iniciadores descritos por Lindsey *et al.* (2017), cuyas secuencias se detallan a continuación:

EC_F: 5’-CCAGGCAAAGAGTTTATGTTGA-3’

EC_R: 5’-GCTATTTCCTGCCGATAAGAGA-3’

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 50 µL, conteniendo 45 µL de la mezcla y 5 µL de ADN molde. En cada reacción se incluyó como control positivo ADN de la cepa *Escherichia coli "Migula"* ATCC 10536. Los reactivos utilizados para la PCR y el proceso de amplificación se llevaron a cabo siguiendo las condiciones que se describen a continuación.

Tabla 14.
Reactivos a utilizar PCR.

Reactivos	Concentración final
Tampón	1 X
dNTPs	100 mM/cada
$MgCl_2$	1,5 mM
Iniciadores	0,375 µM/cada
HotStarTaq	1,25 U

Tabla 15.
Condiciones para la PCR.

Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo	Fases
1	95	10 minutos	Desnaturalización inicial
30	92	1 minuto	Desnaturalización
	72	1 minuto	Unión de iniciadores
		30 segundos	Extensión
1	72	5 minutos	Extensión

Los productos generados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2%, preparado en tampón TAE 1 X, con la adición de 5 µL de RedSafe, y se sometieron a 100 voltios durante 45 minutos. Para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN amplificados se utilizó un marcador de pesos molecular 100-pb.

Finalmente, los fragmentos se visualizarán en un transiluminador (foto documentador) bajo luz ultravioleta (UV). (**LABOLAN, 59912, ESPAÑA**).

4.2.6.4. Preparación del inóculo y aplicación de los discos

Preparación del inóculo y aplicación de los discos (*Arcobacter* spp.)

Todos los aislados obtenidos fueron sembrados en placas de *Arcobacter* agar + 5% de sangre de oveja desfibrilada, y se incubaron a 37ºC durante 48 h en microaerofilia. A partir de este cultivo en fase exponencial de crecimiento, se preparó una suspensión en agua salina al 10%, hasta una turbidez de 0,5 en la escala McFarland (**HARDY DIAGNOSTICS, FU-10560, USA**).

Posteriormente, con la utilización de un hisopo estéril, se realizó la siembra en placas de Mueller Hilton Agar, (**Acumedia®, 7101A, USA**), de forma homogénea. Tras unos minutos en reposo, y con la ayuda de una pinza estéril, los discos fueron colocados sobre la superficie del agar. Finalmente, las placas fueron incubadas bajo condiciones de microaerofília a 37ºC según corresponda durante 48 horas.

Preparación del inóculo y aplicación de los discos (*Escherichia* spp.)

Todos los aislados obtenidos fueron sembrados en placas de NutriAgar y se incubaron a 37ºC durante 48 h en aerobiosis. A partir de este cultivo en fase exponencial de crecimiento, se preparó una suspensión en agua salina al 10% hasta alcanzar una turbidez de 0,5 en la escala McFarland.

Posteriormente, con la utilización de un hisopo estéril, se realizó la siembra en placas de Mueller Hilton Agar (MH) de forma homogénea. Tras unos minutos en reposo, y con la ayuda de una pinza estéril, los discos fueron colocados sobre la superficie del agar. Finalmente, las placas fueron incubadas bajo condiciones de aerofilia a 37ºC durante un periodo de 48 horas.

Dilución para la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se realizaron diluciones de los fármacos en estudio de acuerdo a los tratamientos propuestos en la presente investigación, tanto para Estreptomicina como Ciprofloxacina, se trabajó con disoluciones de 1, 2, 3, 4,10 µg/mL y además como dosis de control se utilizó la concentración de cada fármaco a 5 µg/mL (T0)

Tan pronto el disco impregnado en antibiótico se ubicó en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbió agua y el antibiótico se difundió por el agar, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas las 48 horas de incubación, los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano.

4.2.6.5. Análisis de la sensibilidad antibiótica.

Para el análisis de la susceptibilidad antibiótica se estudiaron los aislados obtenidos a dos antibióticos Ciprofloxacina y Estreptomicina.

Para los dos antibióticos se utilizó el método de difusión en disco (Kirby-Bauer). Este método es una extensión de la técnica de difusión en disco que permite, mediante lectura directa, determinar la susceptibilidad o concentración mínima inhibitoria de los antibióticos en estudio (Ciprofloxacina y Estreptomicina) utilizando distintas concentraciones en dilución de agente antimicrobiano contra los dos agentes patógenos en estudio.

Este método consiste en depositar en la superficie de una placa de agar Mueller-Hinton (MH) previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos

Se midieron los diámetros de las zonas de inhibición de los discos, que corresponden a la Concentración inhibitoria mínima (CMI). Los resultados fueron interpretados de acuerdo a los criterios establecidos por según el Clinical Laboratory and Standards Institute (**CLSI 2010, M45-A2**).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 *Arcobacter spp.*

5.1.1. Reanimación de *Arcobacter* en muestras de quesos.

Durante esta investigación se trabajó con 20 muestras de *Arcobacter spp*, previamente obtenidos del banco bacteriológico de la UEB de investigaciones anteriormente realizadas, que en este caso fueron extraídos de muestras de quesos, por lo que se procedió a reanimar el patógeno previamente almacenado a -20°C, para luego ser reanimado en placas con agar selectivo, para su posterior estudio, en un periodo de 4 semanas, que comprendieron todo el mes de junio del 2019.

Los microorganismos extraídos fueron sometidos a la técnica establecida por Vicente-Martins *et al*. (2017), para el cultivo de *Arcobacter* con el que se procedió al aislamiento de bacterias del género en estudio.

Tabla 16.
Muestras de Arcobacter extraído de quesos.

Arcobacter	**Frecuencia**	**%**
Aislados	20	100

5.1.2 Extracción, concentración y calidad del ADN extraída *Arcobacter*.

Luego de la reanimación de los aislados, se procedió a la extracción de ADN del género en estudio, con la finalidad de analizar su calidad y confirmarlo mediante un análisis molecular, para confirmar que se trataba del género *Arcobacter.* Para la extracción de ADN se emplearon los 20 aislados de quesos previamente obtenidos y supuestos positivos para *Arcobacter,* obtenidos en investigaciones previas.

Tabla 17.
Distribución de tratamientos propuestos según las muestras Arcobacter extraído de quesos.

Aislados		Nano Drop
N°	**Código**	**ng/L**
1	T1R1	19,4
2	T1R2	12,8
3	T1R3	28,1
4	T1R4	14,7
5	T1R5	19,7
6	T1R6	21,2
7	T1R7	18,8
8	T1R8	11,1
9	T1R9	29,9
10	T1R10	30,4
11	T1R11	15,1
12	T1R12	25,9
13	T1R13	20,4
14	T1R14	15,5
15	T1R15	21,0
16	T1R16	10,2
17	T1R17	13,1
18	T1R18	20,0
19	T1R19	25,3
20	T1R20	15,4

Los resultados exponen datos que oscilan entre 10,2 hasta 30,4 ng/µL, la concentración presenta resultados satisfactorios, al ser no menores a 5 ng/ µL como lo manifiesta Guamán, (2017), por lo que podemos enunciar que el ADN conseguido tiene una concentración recomendable para efectuar análisis de carácter molecular consiguiendo resultados satisfactorios.

Entre los 20 aislados a los que se les extrajo el ADN se obtuvieron distintas concentraciones de ADN, el valor más alto fue 30,4 ng/µL y el menor 10,2. ng/µL, emitiendo un promedio de 19,4 ng/µL; todos los resultados expuestos estuvieron en rango de valores de referencia (Guamán, 2017).

La calidad del ADN fue analizada mediante un equipo de electroforesis horizontal en gel de agarosa, para determinar la calidad del ADN extraído y determinar la trans iluminación de este en el gel de agarosa, el gel de agarosa se tiño con colorante (RedSafe), utilizando el método descrito por (Bayas, 2016),

para esto se utilizó un marcador con 50 pb para la electroforesis, en la figura 1 se observan cuales mostraron una iluminación aceptable por este.

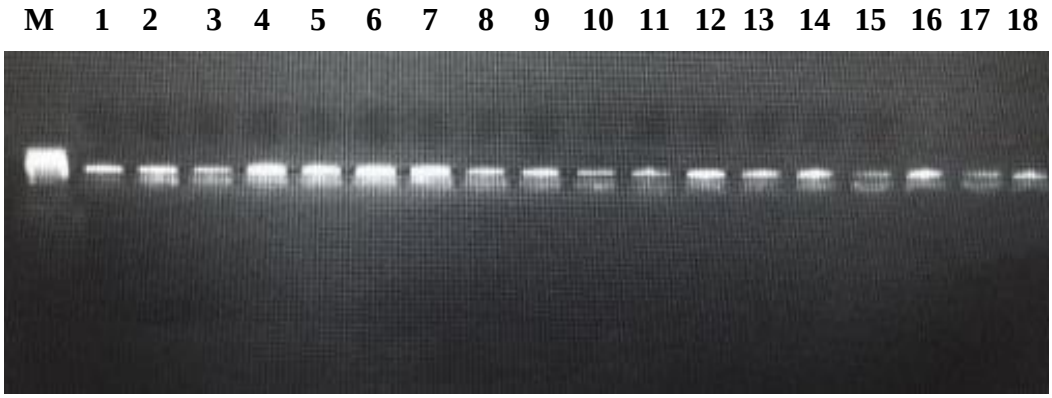


Figura 1. Electroforesis con gel de agarosa de aislados de *Arcobacter*. M: Marcador de pesos moleculares 50-pb; Carril del 1-18: muestras de ADN analizadas.

5.1.3 Análisis molecular para *Arcobacter*

5.1.3.1 Detección de *Arcobacter* por el método de PCR.

Las 20 muestras de aislados de quesos, fueron sometidas a extracción de ADN y posteriormente al análisis por PCR.

El ADN extraído de aislados de quesos fue analizado y amplificado mediante PCR utilizando el método descrito por Bayas, (2016), utilizando el par cebadores descritos por Figueras *et al*. (2012) que amplifican un fragmento de 1026-pb del gen 16S ARNr, como se enunció en las tablas 12 y 13.

Tras el análisis de PCR se obtuvo que el 100 % de aislados correspondieran al género *Arcobacter*.

Tabla 18.
Análisis molecular para aislados de Arcobacter.

Aislados		PCR
N°	código	
1	T1R1	+
2	T1R2	+
3	T1R3	+
4	T1R4	+
5	T1R5	+
6	T1R6	+
7	T1R7	+
8	T1R8	+

9	T1R9	+
10	T1R10	+
11	T1R11	+
12	T1R12	+
13	T1R13	+
14	T1R14	+
15	T1R15	+
16	T1R16	+
17	T1R17	+
18	T1R18	+
19	T1R19	+
20	T1R20	+

Los fragmentos se visualizaron en un trans iluminador, bajo luz ultravioleta (UV), y los resultados se observan en la figura 2.

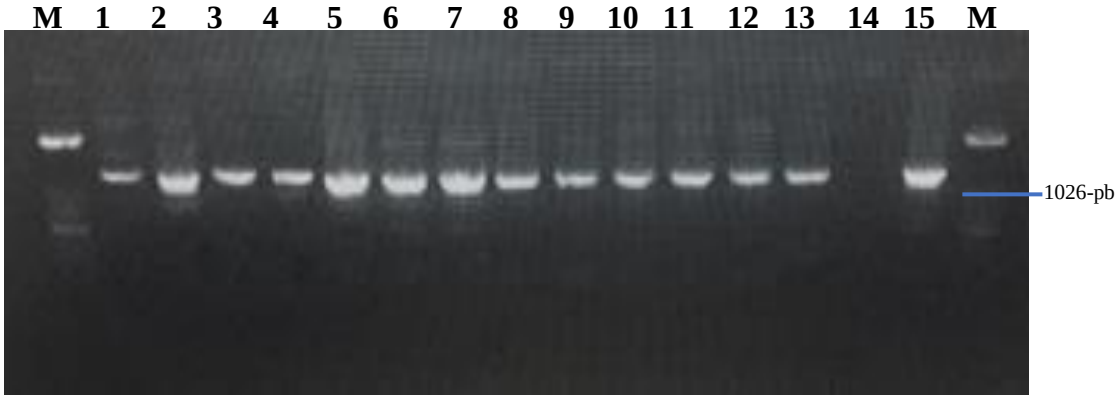


Figura 2. Electroforesis de los resultados del PCR de aislados de *Arcobacter*, M: Marcador de pesos moleculares; Carril 1-13: muestras de ADN amplificado; carril 14 control negativo; carril 15: Control positivo (*Arcobacter butzleri DSM 8739).*

De las 20 muestras de aislados de quesos, que fueron extraídos su ADN, 20 fueron positivos para *Arcobacter* mediante a prueba de PCR, obteniéndose una amplificación a 1026-pb.

Tabla 19.
Tabla de frecuencias y porcentajes para casos positivos de PCR

Positivos PCR	**Frecuencia**	%
Aislados de Quesos	20	100,0

En la tabla 19, podemos observar las frecuencias y porcentajes de casos positivos para PCR, en donde se encontraron 20 casos positivos; confirmando la calidad y confiabilidad de los aislados.

5.1.4 Análisis actividad Antimicrobiana de Estreptomicina y Ciprofloxacina sobre *Arcobacter*.

5.1.4.1. Efecto de la actividad antimicrobiana de Estreptomicina sobre bacterias del género *Arcobacter* aisladas de quesos.

Para determinar la acción de la estreptomicina sobre las bacterias del género *Arcobacter* se analizó su efecto sobre cada uno de los tratamientos mediante un análisis de varianza (DBCA), con la finalidad de encontrar los más y menos efectivos tratamientos contra dichas bacterias.

Tabla 20.
Análisis de varianza (ADEVA) del efecto de la actividad de Estreptomicina sobre bacterias del género Arcobacter

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Repetición	2	5,3	2,64	1,823	0,163 (NS)
Tratamiento	5	32282,6	6456,52	44,33	0,0000 **
Error	352	509,1	1,45		
Total	359	32796,9			CV: 5,52 %

*NS: No significativo; **: Altamente significativo.*

En la tabla 20 se pueden observar los resultados obtenidos al analizar los tratamientos en relación a la bacteria *Arcobacter*, en donde la prueba de Fisher nos indica que:

La no existencia de diferencias significativas en cuanto a bloques o repeticiones, durante esta investigación, esto quiere decir que no existió influencia o efecto sobre los resultados por parte de las repeticiones. En el caso de los tratamientos se estudió el efecto de estreptomicina (distintas dosis), sobre *Arcobacter* spp, cuyas muestras fueron obtenidas de quesos, para estos la prueba de Fisher nos muestra que existió una diferencia altamente significativa, lo que nos indica que las dosis de estreptomicina tienen un distinto efecto inhibitorio sobre la bacteria en estudio.

En relación al coeficiente de variación se encuentra dentro de los parámetros permitidos en vista que presenta valores mayores al 1%, lo que demuestra una perfecta heterogeneidad de los valores de la variable de estudio.

Tabla 21.
Prueba de comparación de medias (Tukey) del efecto de la actividad de Estreptomicina sobre bacterias del género Arcobacter.

Tratamientos	Media	Rangos
T5	31,9	A
T0	20,3	B
T4	12,0	C
T3	8,8	D
T2	6,5	E
T1	4,4	F

Para la determinación del mejor tratamiento, se realizó una prueba de comparación de medias conforme tukey al 5%, mostrando los siguientes resultados: el T5 fue el que presentó una mayor zona de inhibición de crecimiento bacteriano, con un promedio de 31,9 mm, seguido por el tratamiento T0 con un promedio de 20,3 mm conformando los dos mejores tratamientos para la acción de estreptomicina sobre *Arcobacter,* el tratamiento con el promedio más bajo fue el tratamiento T1 con 4,4 mm, cabe destacar que fueron suficientes con 2 μg/mL para interferir con el crecimiento bacteriano, distinto de la concentración de 1 μg/mL de fármaco, que no es suficiente para inhibir el crecimiento de *Arcobacter,* como se observa en la tabla 21. Esto puede ser evidenciado en la figura 3, en donde los tratamientos previamente mencionados, se destacan frente a los demás.

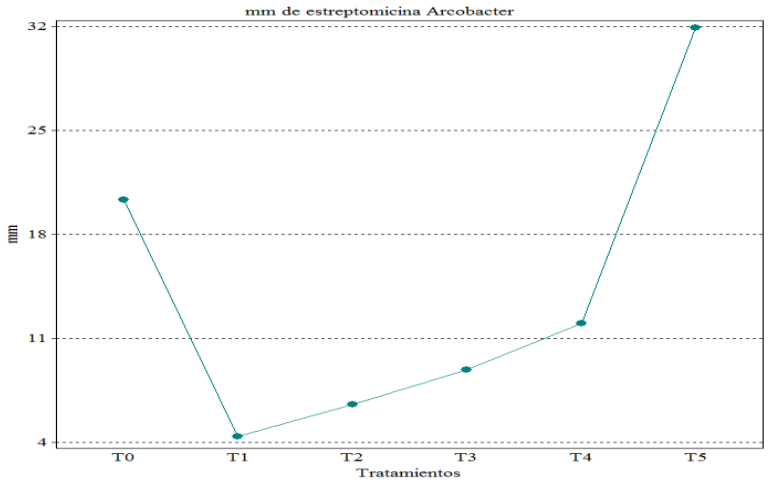


Figura 3. Efecto de la actividad de Estreptomicina sobre bacterias del género *Arcobacter*

5.1.4.2. Efecto de la actividad antimicrobiana de Ciprofloxacina sobre bacterias del género *Arcobacter*.

Para determinar la acción de la Ciprofloxacina sobre las bacterias del género *Arcobacter* se analizó su efecto sobre cada uno de los tratamientos mediante un análisis de varianza (DBCA), con la finalidad de encontrar los tratamientos con los mejores resultados frente dichas bacterias.

Tabla 22.
Análisis de varianza (ADEVA) del efecto de la actividad de Ciprofloxacina sobre bacterias del género Arcobacter.

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Repetición	2	4,6	2,29	1,516	0,132 NS
Tratamiento	5	326,5	65,49	43,57	0,0000 **
Error	352	52,8	1,51		
Total	359	332,8			CV: 9,59%

*NS: No significativo; CV: Coeficiente de variación; **: Altamente significativo.*

En la tabla 22 se pueden observar los resultados obtenidos al analizar los tratamientos en relación a la bacteria *Arcobacter*, en donde la prueba de Fisher nos indica:

La no existencia de diferencias significativas en cuanto a bloques o repeticiones, durante esta investigación, esto quiere decir que no existió influencia o efecto sobre los resultados por parte de las repeticiones.

En el caso de los tratamientos se estudió el efecto de Ciprofloxacina (distintas dosis), sobre la *Arcobacter*, para esto, la prueba de Fisher nos muestra que existió una diferencia altamente significativa, demostrando que las dosis de Ciprofloxacina tienen un distinto efecto inhibitorio sobre la bacteria en estudio.

Tabla 23.
Prueba de comparación de medias (Tukey) del efecto de la actividad de Ciprofloxacina sobre bacterias del género Arcobacter

Tratamientos	Media	Rangos
T5	31,9	A
T0	20,7	B
T4	11,9	C
T3	8,9	D
T2	6,3	E
T1	4,5	F

Para la determinación del mejor tratamiento, se realizó una prueba de comparación de medias de tukey al 5%, donde el T5 fue el que presentó una mayor zona de inhibición de crecimiento bacteriano, con un promedio de 31,9 mm, a continuación se ubicó el tratamiento T0 con un promedio de 20,7 mm conformando los dos mejores tratamientos para la acción de Ciprofloxacina sobre *Arcobacter*, el tratamiento con el promedio más bajo fue el tratamiento T1 con 4,5 mm. De manera que 2 μg/mL fueron suficiente para interferir con el crecimiento bacteriano, distinto de la concentración de 1 μg/mL de fármaco, que resultó ser insuficiente para inhibir el crecimiento de *Arcobacter*. Esto puede ser evidenciado en la figura 4, en donde los tratamientos previamente mencionados, se destacan frente a los demás.

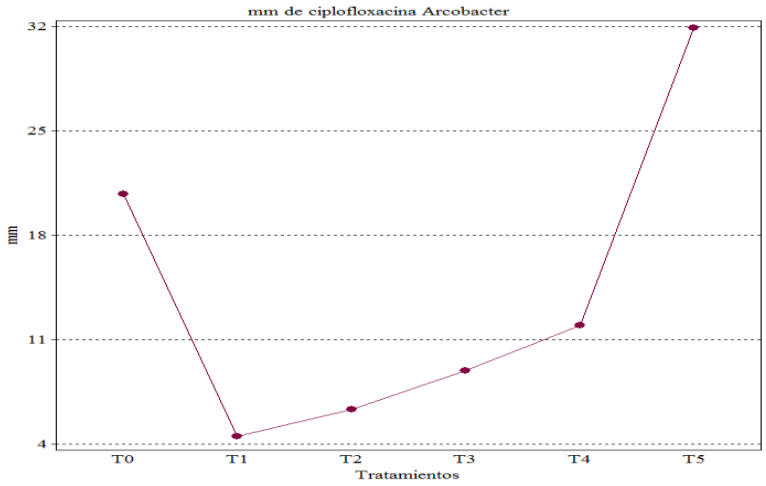


Figura 4. Efecto de la actividad de Ciprofloxacina sobre bacterias del género *Arcobacter*

5.1.5. Análisis de la actividad antimicrobiana de Estreptomicina y Ciprofloxacina sobre bacterias del género *Arcobacter* obtenidas a partir de muestras de quesos frescos.

La interpretación de los resultados se llevó acabo en base a las recomendaciones del comité Europeo de Pruebas de susceptibilidad según el (EUCAST, 2017) y el Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2017) siguiendo los puntos de corte para *Campylobacter*, esto dado a que en la actualidad no se han desarrollado puntos de corte estandarizados para la evaluación de susceptibilidad del género *Arcobacter* spp.

En la tabla 24 se observan los parámetros de la zona inhibitoria que se tomó como referencia para la interpretación de los resultados.

Tabla 24.
Concentración mínima inhibitoria de la susceptibilidad de Arcobacter.

	Difusión de disco(mm)					
Interpretación	**≤6**	**12.**	**13-15**	**16-19**	**20-23**	**≥24**
Guía CLSI	R		I	S		
Guía EUCAST	R				S	
Guía Planteada (Estreptomicina y Ciprofloxacina)	R	I			S	

R: Resistente; I: Intermedio; S: Susceptible

A partir muestras confirmadas positivas para *Arcobacter* spp, mediante PCR, se realizó el antibiograma utilizando la técnica de Difusión disco-placa (Kirby-

Bauer) en agar Mueller-Hinton con la utilización de Estreptomicina y Ciprofloxacina en diferentes concentraciones, los dos fármacos fueron analizados con concentraciones de acuerdo a los tratamientos propuestos (1 µg, 2 µg, 3, µg, 4 µg, 5 µg, 10 µg).

Tabla 25.
Tabla de actividad antimicrobiana de Estreptomicina frente a aislados de Arcobacter spp.

Arcobacter	Código	Concentración de Estreptomicina y Ciprofloxacina											
		(5µg)	P.C	(1µg)	P.C	(2µg)	P.C	(3µg)	P.C	(4µg)	P.C	(10µg)	P.C
#		T0		T1		T2		T3		T4		T5	
1	Q1	19	I	4	R	7	I	8	I	13	I	34	S
2	Q2	19	I	5	R	8	I	10	I	13	I	30	S
3	Q3	20	S	3	R	5	R	8	I	11	S	30	S
4	Q4	19	I	5	R	6	I	8	I	13	I	30	S
5	Q5	22	S	3	R	7	I	9	I	11	S	32	S
6	Q6	19	I	3	R	6	I	9	I	11	S	32	S
7	Q7	18	I	3	R	5	R	10	I	13	I	32	S
8	Q8	21	S	3	R	5	R	10	I	13	I	32	S
9	Q9	21	S	5	R	6	I	8	I	13	I	33	S
10	Q10	20	S	5	R	5	R	8	I	13	I	33	S
11	Q11	23	S	5	R	6	I	9	I	12	S	31	S
12	Q12	22	S	3	R	6	I	9	I	12	S	30	S
13	Q13	21	S	5	R	5	R	10	I	12	S	31	S
14	Q14	19	I	3	R	7	I	9	I	12	S	32	S
15	Q15	21	S	3	R	8	I	8	I	13	I	34	S
16	Q16	18	I	3	R	6	R	10	I	13	I	34	S
17	Q17	20	S	6	R	8	R	9	I	12	S	30	S
18	Q18	20	S	6	R	5	R	8	I	11	S	32	S
19	Q19	22	S	4	R	7	R	9	I	12	S	34	S
20	Q20	18	I	3	R	7	R	8	I	12	S	30	S

R: Resistente; I: Intermedio; S: Susceptible; Q: Quesos; P.I: Puntos de Interpretación; T: Tratamientos

La actividad antimicrobiana de Estreptomicina y Ciprofloxacina frente a aislados de *Arcobacter*, así como su capacidad de resistencia y susceptibilidad a dichos fármacos se puede observar en la tabla 25, resaltados, con tonalidad amarilla se encuentran las muestras que presentaron resistencia a los fármacos en estudio.

Rahimi, (2014), examino la actividad antimicrobiana medida a través de la técnica de difusión en disco a 71 aislados de *Arcobacter*, en su estudio demostró que eran resistentes a uno o más agentes antimicrobianos, donde el resultado más común fue la resistencia a cefalotina y Estreptomicina en un 90 % de los casos, ambos antibióticos a una concentración de 5 µg.

Como podemos observar en la tabla 25, el tratamiento T1, presentó un 100% de resistencia del patógeno a los fármacos en estudio. En la investigación realizada por Milesi (2010), examinó la susceptibilidad antibiótica de 50 cepas de *Arcobacter* extraídas de terneros faenados y recipientes contenedores de leche frente 8 agentes antimicrobianos, para Estreptomicina la concentración utilizada fue de 10 µg, donde determinó que las cepas de *Arcobacter skirrowii*, eran resistentes en un 94% a Estreptomicina, mientras que *A. butzleri* presento gran susceptibilidad en un 88% a Estreptomicina.

El resultado obtenido de la actividad antimicrobiana se puede explicar acotando que el tratamiento que presentó resistencia al fármaco, se trataba de la dilución con menor concentración de Estreptomicina y Ciprofloxacina (1 µg), por lo que podemos expresar que la concentración de este tratamiento no fue la requerida para producir una inhibición total o parcial del crecimiento de *Arcobacter*.

Para el tratamiento T2, con una dilución de fármaco de 2 µg se obtuvo un resultado particular, en el que la mitad de muestras resultaron ser resistentes al fármaco, mientras que la otra mitad, presento una inhibición parcial de crecimiento bacteriano; por lo que se puede enunciar que la concentración del fármaco al 2 µg es suficiente para producir la inhibición bacteriana.

Por otro lado, los tratamientos T0 T3 y T4 (3 µg, 4 µg y 5 µg), cumplieron satisfactoriamente su rol de inhibición total o parcial de *Arcobacter* spp., presentando inhibición total o parcial en todas las muestras a las que fueron sometidas, sin presentar ninguna resistencia bacteriana a estas concentraciones del fármaco. En el caso de T5 (10 µg) se observó una susceptibilidad del 100 % a los antibióticos en estudio (Estreptomicina y Ciprofloxacina), produciendo una

inhibición total del crecimiento de *Arcobacter*, esto debiéndose a la alta concentración del fármaco.

Tabla 26.
Tabla de frecuencias y porcentajes acerca de la susceptibilidad antimicrobiana de Estreptomicina y Ciprofloxacina frente a bacterias del género Arcobacter spp.

Actividad Antimicrobiana	T0		T1		T2		T3		T4		T5	
	Frec.	%	**Frec.**	%	**Frec.**	%	**Frec.**	%	**Frec.**	%	**Frec.**	%
Resistente (R)	0	0	20	100	10	50	0	0	0	0	0	0
Intermedio (I)	8	40	0	0	10	50	20	100	9	45	0	0
Suceptible (S)	12	60	0	0	0	0	0	0	11	55	20	100
TOTAL	20	100	20	100	20	100	20	100	20	100	20	100

En la tabla 26 se muestras las frecuencias y porcentajes acerca de la susceptibilidad antimicrobiana de Estreptomicina frente a aislados de *Arcobacter* spp. Los resultados del tratamiento T1, presentan un nivel de resistencia por parte de los aislados del 100% (20/20); el T2, inhibió el crecimiento de la mitad de los aislados 10/20 (50%); el T3, mostro una inhibición total de los aislados 20/20 (100%); en el T0, 8/20 de casos mostraron un efecto inhibidor parcial o intermedio para *Arcobacter*, siendo estos el 40%; el T4 presentó un 45% (9/20 de casos) de efecto inhibidor parcial o intermedio para *Arcobacter* y 11/20 casos resultaron ser susceptibles, lo que representa el 55%; finalmente, en el T5 inhibió el desarrollo del 100% (20/20) de los aislados de *Arcobacter* en estudio.

Fanelli *et al,* (2019), obtuvieron 55 cepas de *Arcobacter butzleri* que fueron aislados a partir de almejas (*Tapes philippinarum*) y mejillones (*Mytilus galloprovincialis*), obtenidos de mercados de mariscos en la región de Apulia, Italia, en las que probaron la resistencia antimicrobiana a varios agentes antimicrobianos entre estos Estreptomicina en una concentración de 10 µg, presentando una susceptibilidad del 96,4 %., este resultado podemos relacionar a los obtenidos en nuestra investigación, en la cual el nivel susceptibilidad de Arcobacter fue del 100 % frente a estreptomicina. Por otra parte, Ferreira *et al*,

(2019), demostraron que *A. butzleri* fue la especie más susceptible en un 90% a estreptomicina (5 µg), gentamicina y kanamicina; mientras que la tasa de resistencia bacteriana de *A. cryaerophilus* a estreptomicina fue del 30% (significativamente alta).

En la figura 5 se presentan la Susceptibilidad antimicrobiana de Estreptomicina y Ciprofloxacina frente a bacterias del género *Arcobacter spp.*

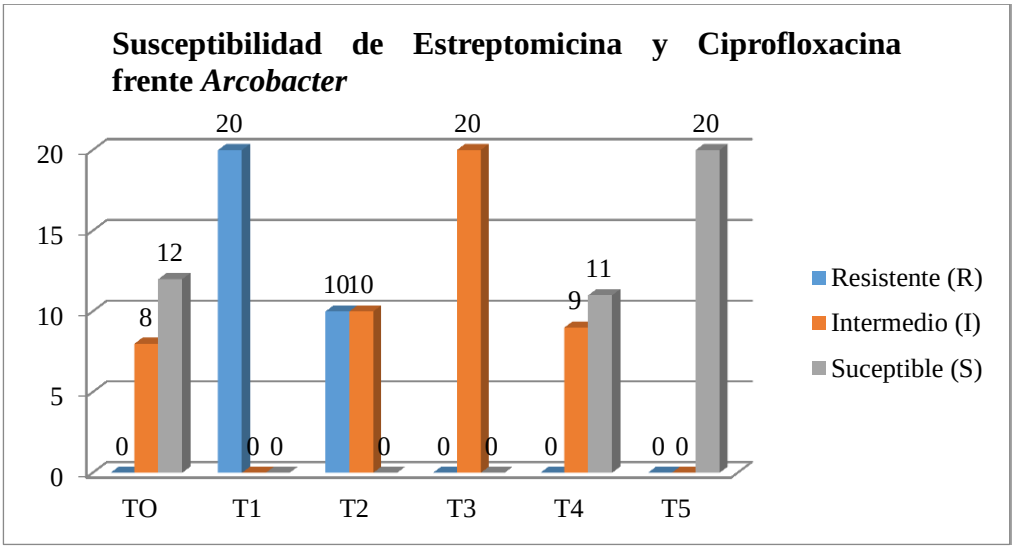


Figura 5. *Susceptibilidad antimicrobiana de Estreptomicina y Ciprofloxacina frente a bacterias del género Arcobacter* spp.

5.2.1 Reanimación de *Escherichia* en muestras de carne y agua.

Durante esta investigación se trabajó con 40 aislados de *Escherichia*, los microorganismos extraídos fueron sometidos a la técnica establecida por López *et al*. (2019), para el cultivo de *Escherichia* spp. en agua y carnes con el que se procedió a la reanimación de bacterias del género en estudio.

Tabla 27.
Muestras de Escherichia extraído de carnes y agua.

Escherichia	Frecuencia	%
Aislados	40	100

5.2.2 Extracción, concentración y calidad del ADN extraída *Escherichia*.

Luego de la reanimación de los aislados, se procedimos a la extracción de ADN del género *Escherichia*, esto con la finalidad de analizar su calidad, pureza (Tabla 28) y confirmarlo mediante amplificación por PCR.

Tabla 28.
Distribución de tratamientos propuestos según las muestras de Escherichia extraído de carne y agua.

Aislados		Nano Drop
N°	código	N°
1	T1R1	29,4
2	T1R2	15,8
3	T1R3	23,1
4	T1R4	18,7
5	T1R5	12,7
6	T1R6	21,2
7	T1R7	11,8
8	T1R8	12,1
9	T1R9	23,9
10	T1R10	31,8
11	T1R11	16,1
12	T1R12	20,9
13	T1R13	18,4
14	T1R14	11,5
15	T1R15	10,0
16	T1R16	15,2
17	T1R17	16,1
18	T1R18	28,0
19	T1R19	24,3
20	T1R20	14,4

Aislados		Nano Drop
N°	código	N°
21	T1R1	13,9
22	T1R2	12,2
23	T1R3	20,5
24	T1R4	17,4
25	T1R5	16,6
26	T1R6	28,6
27	T1R7	18,8
28	T1R8	19,2
29	T1R9	24,1
30	T1R10	20,5
31	T1R11	16,3
32	T1R12	15,2
33	T1R13	22,1
34	T1R14	25,0
35	T1R15	29,0
36	T1R16	17,8
37	T1R17	18,2
38	T1R18	28,7
39	T1R19	23,6
40	T1R20	19,9

Los resultados de contenido de ADN de los 40 aislados muestran datos que van de entre 10,0 hasta 31,8 ng/µL, y un valor medio de 19,5 ng/µL, las concentraciones obtenidas exhiben resultados favorables, al no ser menor de 5 ng/µL como lo describe Guamán, (2017), por lo que podemos manifestar que el ADN obtenido tiene una concentración óptima para realizar análisis molecular correspondiente.

La calidad del ADN fue analizada mediante un equipo de electroforesis horizontal en gel, conforme la metodología establecida por Bayas, (2016), en la figura 6 se observan que todas las muestras presentaron una iluminación aceptable.

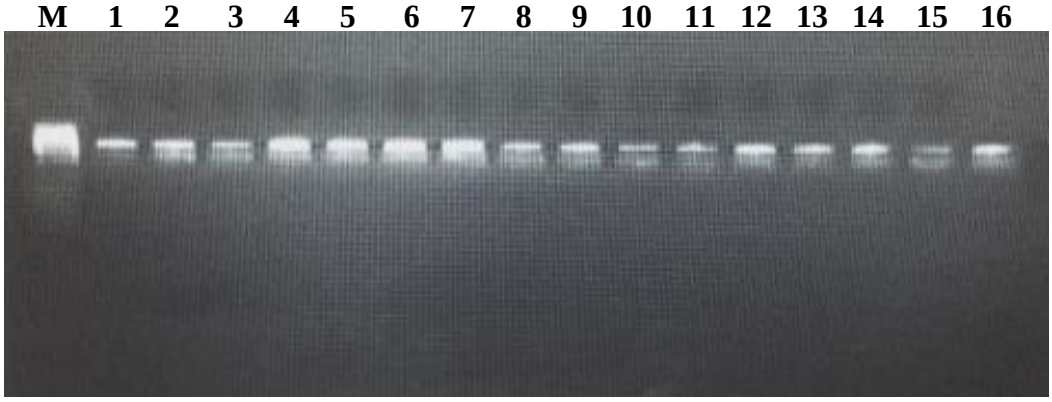


Figura 6. Electroforesis con gel de agarosa de aislados de *Escherichia.* M: Marcador de pesos moleculares 50-pb; Carril del 1-16: muestras de ADN analizadas.

5.2.3 Análisis molecular para *Escherichia*

5.2.3.1 Amplificación de *Escherichia* mediante PCR

Tras el análisis de PCR se confirmó que el 100 % de aislados correspondieran al género *Escherichia* spp, tanto para los aislados obtenidos de muestras de agua como para los obtenidos de carne (Tabla 29).

Tabla 29.
Análisis molecular para aislados de Escherichia

Aislados		PCR
N°	código	
1	T1R1	+
2	T1R2	+
3	T1R3	+
4	T1R4	+
5	T1R5	+
6	T1R6	+
7	T1R7	+
8	T1R8	+
9	T1R9	+
10	T1R10	+
11	T1R11	+

Aislados		PCR
N°	código	
21	T1R1	+
22	T1R2	+
23	T1R3	+
24	T1R4	+
25	T1R5	+
26	T1R6	+
27	T1R7	+
28	T1R8	+
29	T1R9	+
30	T1R10	+
31	T1R11	+

12	T1R12	+	32	T1R12	+
13	T1R13	+	33	T1R13	+
14	T1R14	+	34	T1R14	+
15	T1R15	+	35	T1R15	+
16	T1R16	+	36	T1R16	+
17	T1R17	+	37	T1R17	+
18	T1R18	+	38	T1R18	+
19	T1R19	+	39	T1R19	+
20	T1R20	+	40	T1R20	+

Finalmente, los fragmentos se visualizaron en un transiluminador, bajo luz ultravioleta (UV). Los resultados se observan en la figura 7.

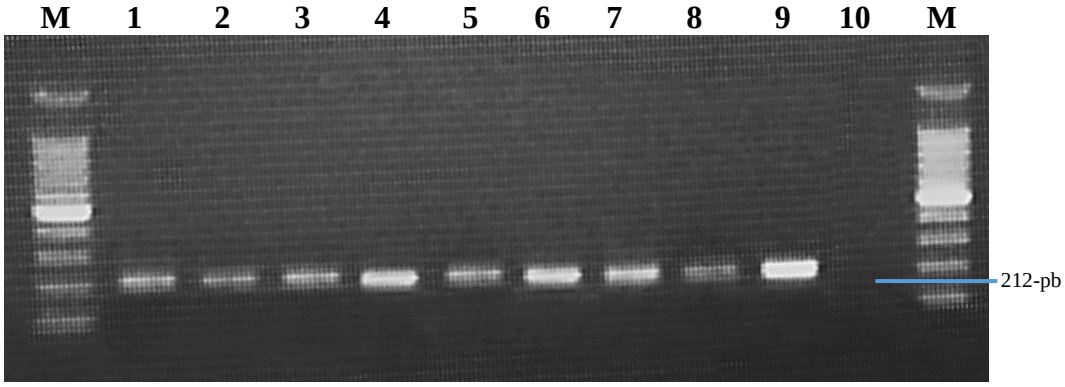


Figura 7. *Electroforesis de los resultados del PCR de aislados de Escherichia, M: Marcador de pesos moleculares; Carril 1-8: muestras de ADN amplificado; carril 9 control positivo (Escherichia coli "Migula"* ATCC 10536*); carril 10: Control negativo.*

Tabla 30.
Tabla de frecuencias y porcentajes para casos positivos por PCR

Positivos PCR	**Frecuencia**	**%**
Aislados de Carne y Agua	40	100,0

En la tabla 30 podemos observar las frecuencias y porcentajes de casos positivos para PCR, en donde se encontraron 40 casos positivos; confirmando la calidad y confiabilidad de los aislados.

5.2.4 Análisis actividad Antimicrobiana de Estreptomicina y Ciprofloxacina sobre aislados de *Escherichia*

5.2.4.1. Efecto de la actividad antibacteriana de Estreptomicina sobre *Escherichia* aislada de carne

Se analizó su efecto sobre cada uno de los tratamientos mediante un análisis de varianza (DBCA), con la finalidad de encontrar aquellos que son mejores contra dichas bacterias.

Tabla 31.
Análisis de varianza (ADEVA) del efecto de la actividad de Estreptomicina sobre Escherichia aislada de carne

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Repetición	2	1,9	0,95	0,50	0,198 NS
Tratamiento	5	165,2	3361,04	177,33	0,0023**
Error	352	66,8	1,89		
Total	359	174,9			CV 8,71 %

*NS: No significativo; CV: Coeficiente de variación; **: Altamente significativo.*

En la tabla 31 se pueden observar los resultados obtenidos al analizar los tratamientos en relación a la bacteria *Escherichia*, en donde la prueba de Fisher nos indica:

La no existencia de diferencias significativas en cuanto a bloques o repeticiones, durante esta investigación, esto quiere decir que no existió influencia o efecto sobre los resultados por parte de las repeticiones. En el caso de los tratamientos se estudió el efecto de estreptomicina (distintas dosis), sobre la bacteria del género *Escherichia* aislada de carne, para estos la prueba de Fisher nos muestra que existió una diferencia altamente significativa, lo que nos indica que las dosis de estreptomicina tienen un distinto efecto inhibitorio sobre la bacteria en estudio.

En relación al coeficiente de variación se encuentra dentro de los parámetros permitidos en vista que presenta valores mayores al 1%, lo que demuestra una perfecta heterogeneidad de los valores de la variable de estudio.

Tabla 32.
Prueba de comparación de medias (Tukey) del efecto de la actividad de Estreptomicina sobre bacterias del género Escherichia aislada de carne

Tratamientos	Media	Rangos
T5	26,1	A
T0	19,1	B
T4	15,6	C
T3	9,0	D
T2	8,9	D
T1	6,5	E

Para la determinación del mejor tratamiento, se realizó una prueba de comparación de medias conforme tukey al 5%, la cual muestra que el tratamiento T5 fue el que presentó una mayor zona de inhibición de crecimiento bacteriano, con un promedio de 26,1 mm, seguido por el tratamiento T0 con un promedio de 19,1 mm conformando los dos mejores tratamientos para la acción de Estreptomicina sobre *Escherichia*, el tratamiento con el promedio más bajo fue el tratamiento T1 con 6,5 mm. Esto puede ser evidenciado en la figura 8. En donde los tratamientos previamente mencionados, se destacan frente a los demás tratamientos.

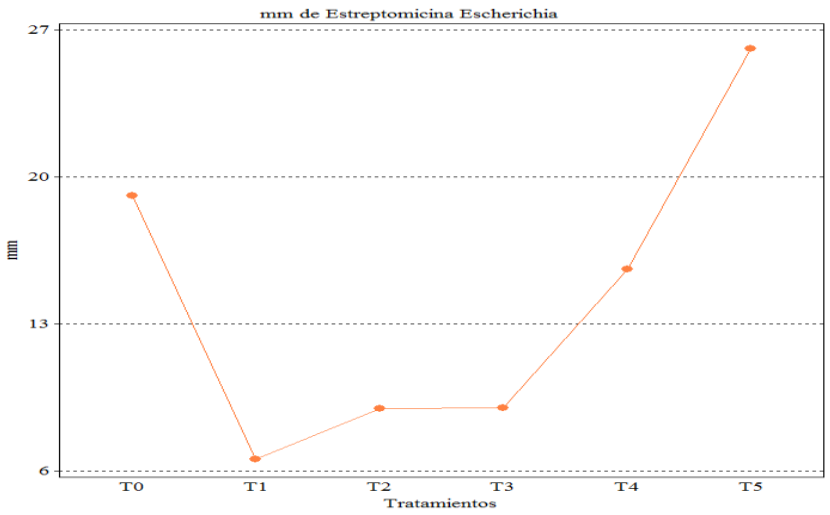


Figura 8. Efecto de la actividad de Estreptomicina sobre bacterias del género *Escherichia* aislada de carne

5.2.4.2. Efecto de la actividad de Ciprofloxacina sobre *Escherichia* aislada de carne

Para determinar la acción de la Ciprofloxacina sobre *Escherichia* se analizó su efecto sobre cada uno de los tratamientos mediante un análisis de varianza (DBCA), con la finalidad de encontrar los más y menos efectivos tratamientos contra dichas bacterias.

Tabla 33.
Análisis de varianza (ADEVA) del efecto de la actividad antibacteriana de Ciprofloxacina Escherichia aislada de carne

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Repetición	2	0,8	0,39	0,375	0,199 NS
Tratamiento	5	292,1	58,02	56,64	0,0046 **
Error	352	36,6	1,04		
Total	359	296,5			CV 5,24 %

*NS: No significativo; CV: Coeficiente de variación; **: Altamente significativo.*

En la tabla 33 se pueden observar los resultados obtenidos al analizar los tratamientos en relación a la bacteria *Escherichia*, en donde la prueba de Fisher nos indica:

La no existencia de diferencias significativas en cuanto a bloques o repeticiones, durante esta investigación quiere decir que no existió influencia o efecto sobre los resultados por parte de las repeticiones. En el caso de los tratamientos se estudió el efecto de Ciprofloxacina (distintas dosis), sobre la bacteria del género *Escherichia* aislada de carnes, para estos la prueba de Fisher nos muestra que existió una diferencia altamente significativa, demostrando que las dosis de Ciprofloxacina tienen un distinto efecto inhibitorio sobre la bacteria en estudio.

Cagnacci *et al*, (2018), investigaron la susceptibilidad de *Escherichia* a varios agentes antimicrobianos, entre ellos Ciprofloxacina con una concentración del 5 µL, con la cual obtuvieron una susceptibilidad del 87,9%. Comparando los resultados expuestos podemos aseverar que son similares a los obtenidos en este trabajo donde la susceptibilidad del patógeno a Ciprofloxacina fue del 80 %.

En relación al coeficiente de variación se encuentra dentro de los parámetros permitidos en vista que presenta valores mayores al 1%, lo que demuestra una perfecta heterogeneidad de los valores de la variable de estudio.

Tabla 34.
Prueba de comparación de medias (Tukey) del efecto de la actividad de Ciprofloxacina sobre Escherichia aislada de carne

Tratamientos	Media	Rangos
T5	34,0	A
T0	25,45	B
T4	22,38	C
T3	16,2	D
T2	12,0	E
T1	6,6	F

Para la determinación del mejor tratamiento, se realizó una prueba de comparación de promedios según tukey al 5%, mediante el cual el tratamiento T5 fue el que presentó una mayor zona de inhibición de crecimiento bacteriano, con un promedio de 34,0 mm, seguido por el tratamiento T0 con un promedio de 25,45 mm, conformando los dos mejores tratamientos para la acción de Ciprofloxacina sobre *Escherichia*, el tratamiento con el promedio más bajo fue el tratamiento T1 con 6,6 mm. Esto puede ser evidenciado en la figura 9, en donde los tratamientos previamente mencionados, se destacan frente a los demás.

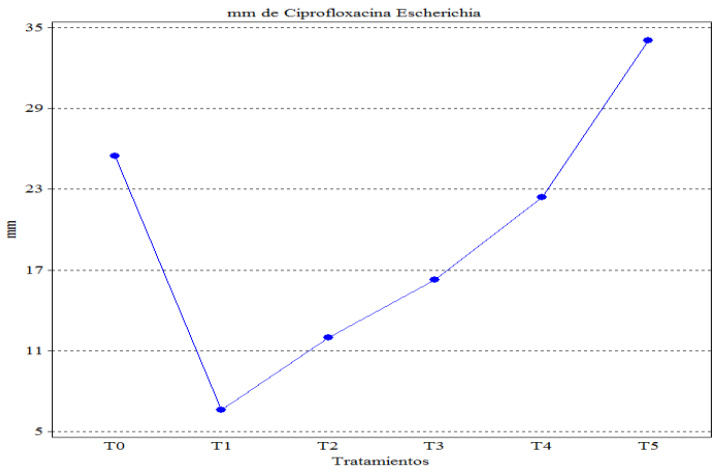


Figura 9. Efecto de la actividad de Ciprofloxacina sobre bacterias del género *Escherichia* aislada de carne

5.2.4.3. Efecto de la actividad de Estreptomicina sobre bacterias del género *Escherichia* aisladas de agua

Para comprobar el efecto de la estreptomicina sobre las bacterias del género *Escherichia* se analizó su efecto sobre cada uno de los tratamientos mediante un análisis de varianza (DBCA), con la finalidad de encontrar aquellos que son mejores contra dichas bacterias.

Tabla 35.
Análisis de varianza (ADEVA) del efecto de la actividad de Estreptomicina sobre bacterias del género Escherichia aisladas de agua.

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Repetición	2	2,8	1,41	0,73	0,145 NS
Tratamiento	5	190,3	38,86	19,69	0,0098**
Error	352	672,5	1,91		
Total	359	197,7			CV 8,58 %

*NS: No significativo; CV: Coeficiente de variación; **: Altamente significativo.*

En la tabla 35 se pueden observar los resultados obtenidos al analizar los tratamientos en relación a la bacteria *Escherichia*, en donde la prueba de Fisher nos indica:

La no existencia de diferencias significativas en cuanto a bloques o repeticiones, durante esta investigación, esto quiere decir que no existió influencia o efecto sobre los resultados por parte de las repeticiones. En el caso de los tratamientos se estudió el efecto de estreptomicina (distintas dosis), sobre la bacteria *Escherichia* aisladas de agua, para estos la prueba de Fisher nos muestra que existió una diferencia altamente significativa, lo que nos indica que las dosis de estreptomicina tienen un distinto efecto inhibitorio sobre la bacteria en estudio.

Tabla 36.
Prueba de comparación de medias (Tukey) del efecto de la actividad de Estreptomicina sobre bacterias del género Escherichia aisladas de agua

Tratamientos	Media	Rangos
T5	27,0	A
T0	20,0	B
T4	15,3	C
T3	9,1	D
T2	8,5	D
T1	6,3	E

Para la determinación del mejor tratamiento, se realizó una prueba Pos-Hoc de comparación de medias según tukey al 5%, mediante el cual, se muestra que el tratamiento T5 fue el que presentó una mayor zona de inhibición de crecimiento bacteriano con un promedio de 27,0 mm; seguido por el tratamiento T0 con un promedio de 20,0 mm, conformando los dos mejores tratamientos para la acción de estreptomicina sobre *Escherichia*, el tratamiento con el promedio más bajo resultó ser el T1 con 6,3 mm.

Seung-Hee *et al*, (2011), investigaron la resistencia antimicrobiana de *Escherichia*, aislada de mariscos en Seúl, donde observaron una resistencia del 12,8 % a estreptomicina (5 µg), siendo uno de los fármacos que presentaron la mayor resistencia antibacteriana, comparando con los resultados obtenidos en esta investigación, podemos considerar que mientras la concentración del fármaco aumenta, la resistencia bacteriana disminuye. Esto puede ser evidenciado en la figura 10, en donde los tratamientos previamente mencionados, se destacan frente a los demás.

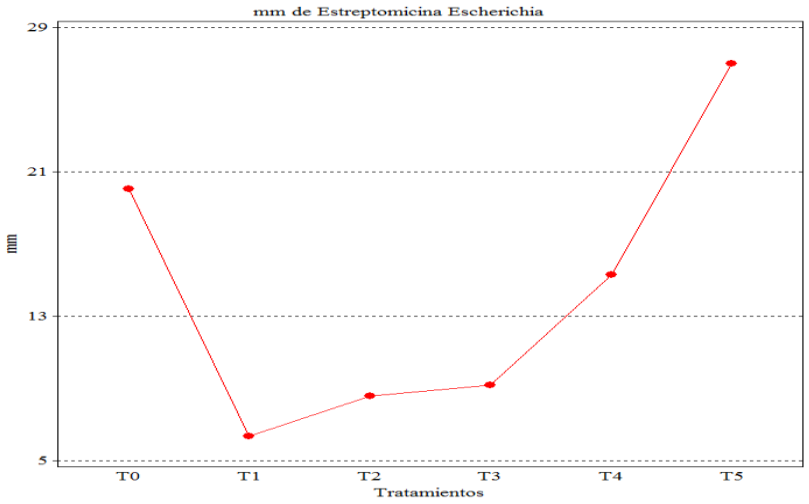


Figura 10. Efecto de la actividad de Estreptomicina sobre bacterias del género *Escherichia* aisladas de agua.

5.2.4.4. Efecto de la actividad de Ciprofloxacina sobre bacterias del género *Escherichia* aisladas de agua

Para determinar la acción de la Ciprofloxacina sobre las bacterias del género *Escherichia* se analizaron su efecto sobre cada uno de los tratamientos mediante un análisis de varianza (DBCA), con la finalidad de encontrar las concentraciones de antibiótico necesario para inhibir el desarrollo de la bacteria en estudio.

Tabla 37.
Análisis de varianza (ADEVA) del efecto de la actividad de Ciprofloxacina sobre bacterias del género Escherichia aisladas de agua

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Repetición	2	2,6	1,32	1,16	0,153 NS
Tratamiento	5	235,6	461,11	40,32	0,0023 **
Error	352	398,3	1,13		
Total	359	234,5			CV 7,44 %

*NS: No significativo; CV: Coeficiente de variación; **: Altamente significativo.*

En la tabla 37 se pueden observar los resultados obtenidos al analizar los tratamientos en relación a la bacteria *Escherichia*, en donde la prueba de Fisher nos indica:

La no existencia de diferencias significativas en cuanto a bloques o repeticiones, durante esta investigación, esto quiere decir que no existió influencia o efecto sobre los resultados por parte de las repeticiones.

En el caso de los tratamientos se estudió el efecto de Ciprofloxacina (distintas dosis), sobre la bacteria *Escherichia* aislada de agua, donde la prueba de Fisher nos indica que existió una diferencia altamente significativa, demostrando que las dosis de Ciprofloxacina tienen un distinto efecto inhibitorio sobre la bacteria en estudio.

Tabla 38.
Prueba de comparación de medias (Tukey) del efecto de la actividad de Ciprofloxacina sobre bacterias del género Escherichia aisladas de agua

Tratamientos	Media	Rangos
T5	30,9	A
T0	25,6	B
T4	22,9	C
T3	16,0	D
T2	11,8	E
T1	8,0	F

Para la determinación del mejor tratamiento, se realizó una prueba Pos-Hoc de comparación de medias conforme tukey al 5%, donde el tratamiento T5 fue el que presentó una mayor zona de inhibición de crecimiento bacteriano, con un promedio de 30,9 mm; seguido por el tratamiento T0 con un promedio de 25,6 mm conformando los dos mejores tratamientos para la acción de Ciprofloxacina sobre *Escherichia*, el tratamiento con el promedio más bajo fue el tratamiento T1 con 8,0 mm. Esto puede ser evidenciado en la figura 11, en donde los tratamientos previamente mencionados, se destacan frente a los demás.

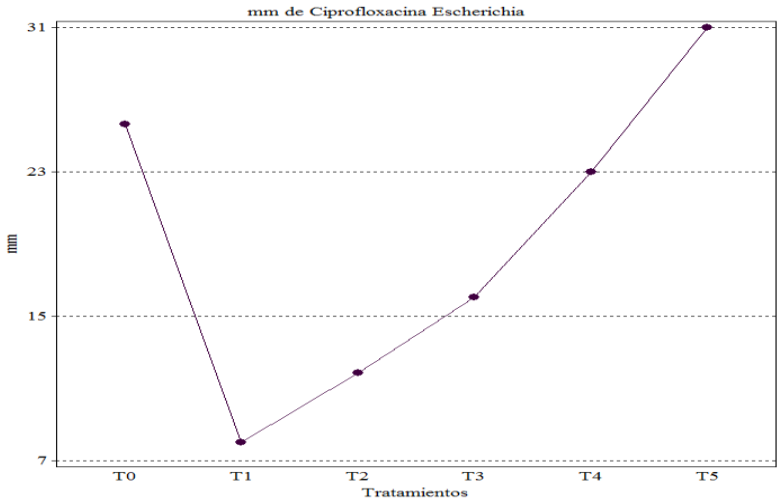


Figura 11. Efecto de la actividad de Ciprofloxacina sobre bacterias del género *Escherichia* aisladas de agua.

5.2.5. Análisis de la actividad antimicrobiana de Estreptomicina sobre bacterias del género *Escherichia* obtenidas a partir de muestras de carne y agua.

La interpretación de los resultados se llevó acabo en base a las recomendaciones del comité Europeo de Pruebas de susceptibilidad según el (EUCAST, 2017) y el Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2017) siguiendo los puntos de corte (Breakpoints) estandarizados para la evaluación de susceptibilidad del género *Escherichia* spp frente a Estreptomicina. En la tabla 39 se observan los parámetros de la zona inhibitoria que se tomó como referencia para la interpretación de los resultados obtenidos en la prueba de actividad antimicrobiana.

Adzitey, *et al* (2013), obtuvieron 55 aislados de *Escherichia* de patos en Penang, Malaysia, donde fueron examinados para su susceptibilidad antibacteriana frente a 11 antibióticos, de los cuales, obtuvieron resistencia antimicrobiana variada, específicamente para Estreptomicina (4 µg) con una resistencia del 98 %, relacionando con los resultados obtenidos mencionada investigación podemos corroborar que estos fueron similares a los obtenidos en nuestro trabajo, dado a que en la concentración T4 todos los aislados fueron resistentes.

Tabla 39.
Concentración mínima inhibitoria de la susceptibilidad del género Escherichia spp. *frente a Estreptomicina.*

Interpretación	Difusión de disco (mm)		
	≤11	12-17	<18
Guía CLSI	R	I	S
Guía EUCAST	R		S
Puntos de corte (Breakpoints) para Estreptomicina	R	I	S

R: Resistente; I: Intermedio; S: Susceptible

La actividad antimicrobiana de Estreptomicina frente a aislados de *Escherichia* spp, así como su capacidad de resistencia y susceptibilidad a dicho fármaco se puede observar en la tabla 40, resaltados, con tonalidad amarilla se encuentran las muestras que presentaron resistencia a los fármacos en estudio.

Tabla 40.
Tabla de actividad antimicrobiana de Estreptomicina frente a aislados de Escherichia spp.

Escherichia	Código	Concentración de Estreptomicina											
		(5µg)	P.C	(1µg)	P.C	(2µg)	P.C	(3µg)	P.C	(4µg)	P.C	(10µg)	P.C
#		T0		T1		T2		T3		T4		T5	
1	A1	19	S	8	R	9	R	14	I	17	I	25	S
2	A2	19	S	5	R	12	I	14	I	17	I	24	S
3	A3	18	S	5	R	9	R	15	I	15	I	30	S
4	A4	18	S	7	R	8	R	13	I	14	I	27	S
5	A5	21	S	8	R	9	R	13	I	17	I	29	S
6	A6	19	S	7	R	9	R	13	I	15	I	30	S
7	A7	19	S	7	R	12	I	13	I	14	I	29	S
8	A8	21	S	7	R	9	R	13	I	15	I	25	S
9	A9	20	S	5	R	12	I	12	I	16	I	26	S
10	A10	20	S	6	R	8	R	13	I	15	I	29	S
11	A11	21	S	5	R	9	R	12	I	15	I	27	S
12	A12	18	S	8	R	7	R	13	I	15	I	24	S
13	A13	18	S	8	R	9	R	14	I	16	I	30	S
14	A14	19	S	8	R	12	I	12	I	16	I	26	S
15	A15	22	S	8	R	8	R	13	I	17	I	25	S
16	A16	22	S	6	R	12	I	14	I	14	I	29	S
17	A17	18	S	6	R	8	R	15	I	15	I	29	S
18	A18	19	S	8	R	12	I	13	I	14	I	27	S
19	A19	19	S	5	R	12	I	14	I	15	I	30	S
20	A20	18	S	7	R	9	R	13	I	14	I	24	S
21	C1	19	S	8	R	12	I	14	I	15	I	24	S

22	C2	19	S	8	R	8	R	15	I	14	I	24	S
23	C3	19	S	8	R	12	I	16	I	15	I	27	S
24	C4	19	S	7	R	12	I	14	I	15	I	24	S
25	C5	20	S	8	R	8	R	14	I	17	I	25	S
26	C6	20	S	8	R	8	R	15	I	16	I	26	S
27	C7	20	S	7	R	12	I	16	I	17	I	28	S
28	C8	18	S	8	R	9	R	16	I	17	I	25	S
29	C9	20	S	6	R	8	R	15	I	17	I	30	S
30	C10	20	S	8	R	8	R	13	I	16	I	23	S
31	C11	19	S	5	R	9	R	13	I	16	I	26	S
32	C12	19	S	5	R	8	R	13	I	14	I	25	S
33	C13	20	S	6	R	12	I	14	I	15	I	27	S
34	C14	20	S	6	R	8	R	14	I	16	I	26	S
35	C15	20	S	6	R	12	I	14	I	16	I	22	S
36	C16	19	S	5	R	9	R	15	I	15	I	30	S
37	C17	20	S	5	R	9	R	14	I	14	I	30	S
38	C18	20	S	7	R	12	I	12	I	16	I	25	S
39	C19	18	S	8	R	8	R	13	I	16	I	29	S
40	C20	19	S	7	R	12	I	14	I	16	I	22	S

R: Resistente; I: Intermedio; S: Susceptible; C: Carne; A: Agua; P.C: Puntos de Corte; T: Tratamientos

Como podemos observar en la tabla 40, T1, presentó un 100% de los aislados presentó resistencia al fármaco en estudio (Estreptomicina). El resultado obtenido de la actividad antimicrobiana se puede explicar acotando que el tratamiento que presentó resistencia al fármaco, se trataba de la dilución con menor concentración de Estreptomicina (1 µg), por lo que podemos considerar que la concentración de este tratamiento no fue la requerida para producir una inhibición total o parcial del crecimiento bacteriano de *Escherichia* spp.

El tratamiento T2 (2 µg) mostró un resultado particular, dado a que en su mayoría presento resistencia bacteriana, aunque una parte significativa de las muestras (aislados) presento inhibición parcial al fármaco en estudio. Por otro lado, el tratamiento T0, T3 y T4 (5 µg, 3 µg y 4 µg), cumplieron satisfactoriamente su rol de inhibición total o parcial de *Escherichia* spp., presentando inhibición total o parcial en todas los aislados.

En el caso de T5 (10 µg) se observó una susceptibilidad del 100% al fármaco en estudio (Estreptomicina), produjo un efecto inhibitorio total del crecimiento bacteriano de *Escherichia* spp.

Tabla 41.
Tabla de frecuencias y porcentajes acerca de la susceptibilidad antimicrobiana de Estreptomicina frente a bacterias del género Escherichia spp.

Actividad Antimicrobiana	T0		T1		T2		T3		T4		T5	
	Frec.	%	**Frec.**	%	**Frec.**	%	**Frec.**	%	**Frec.**	%	**Frec.**	%
Resistente (R)	0	0	40	100	26	65	0	0	0	0	0	0
Intermedio (I)	0	0	0	0	14	35	40	100	40	100	0	0
Susceptible (S)	40	100	0	0	0	0	0	0	0	0	40	100
TOTAL	40	100	40	100	40	100	40	100	40	100	40	100

En la tabla 41 se presentan la frecuencias y porcentajes acerca de la susceptibilidad antimicrobiana de Estreptomicina frente a los 40 aislados de *Escherichia* spp.

Los resultados de tratamiento T1, presentan un nivel de resistencia del 100% (40/40); el tratamiento T2, mostro un 65% (26/40) de resistencia bacteriana por, mientras que el 35% (14/40) presento efecto inhibitorio; los tratamientos T0, T4 y T5 presentaron susceptibilidad bacteriana en un 100% (40/40 de casos). En la figura 12 se presentan la susceptibilidad antimicrobiana de Estreptomicina frente a bacterias del género *Escherichia* spp.

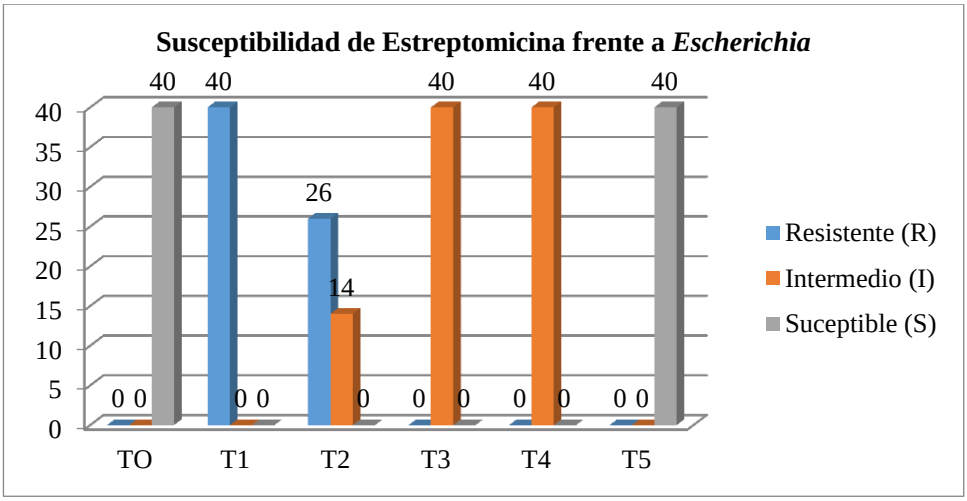


Figura 12. Susceptibilidad antimicrobiana de Estreptomicina frente a bacterias del género *Escherichia* spp.

5.2.5.1. Análisis de la actividad antimicrobiana de Ciprofloxacina sobre bacterias del género *Escherichia* obtenidas de muestras de carne y agua.

La interpretación de los resultados se llevó acabo en base a las recomendaciones del comité Europeo de Pruebas de susceptibilidad según el (EUCAST, 2017) y el Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2017) siguiendo los puntos de corte (Breakpoints) estandarizados para la evaluación de susceptibilidad del género *Escherichia* spp. frente a Ciprofloxacina.

En la tabla 42 se observan los parámetros de la zona inhibitoria que se tomó como referencia para la interpretación de los resultados obtenidos en la prueba de antibiograma.

Tabla 42.
Concentración mínima inhibitoria de la susceptibilidad del género Escherichia spp *frente a Ciprofloxacina.*

Interpretación	**Difusión de disco (mm)**		
	<11	**12-24**	**>25**
Guía CLSI	R	I	S
Guía EUCAST	R	I	S
Puntos de corte (Breakpoints) para Ciprofloxacina	R	I	S

R: Resistente; I: Intermedio; S: Susceptible

La actividad antimicrobiana de Ciprofloxacina frente a aislados de *Escherichia* spp, así como su capacidad de resistencia y susceptibilidad a dichos fármacos se puede observar en la tabla 43, resaltados, con tonalidad amarilla se encuentran las muestras que presentaron resistencia a los fármacos en estudio.

Tabla 43.
Tabla de actividad antimicrobiana de Ciprofloxacina frente a aislados de Escherichia spp.

Escherichia	**Código**	**Concentración de Ciprofloxacina**											
		(5µg)	**P.I**	**(1µg)**	**P.I**	**(2µg)**	**P.I**	**(3µg)**	**P.I**	**(4µg)**	**P.I**	**(10µg)**	P.I
#		**T0**		**T1**		**T2**		**T3**		**T4**		**T5**	
1	A1	27	S	7	R	12	I	16	I	24	I	33	S
2	A2	25	S	7	R	13	I	18	I	22	I	35	S
3	A3	26	S	6	R	12	I	15	I	24	I	35	S

4	A4	25	S	7	R	13	I	18	I	24	I	33	S
5	73A5	24	I	7	R	12	I	14	I	22	I	35	S
6	A746	26	S	7	R	13	I	18	I	23	I	35	S
7	A774	26	S	6	R	12	I	16	I	23	I	33	S
8	A8	27	S	7	R	12	I	14	I	22	I	34	S
9	A9	26	S	6	R	11	R	14	I	22	I	33	S
10	A10	27	S	7	R	11	R	17	I	24	I	35	S
11	A11	24	I	7	R	13	I	17	I	23	I	34	S
12	A12	24	I	6	R	13	I	14	I	24	I	33	S
13	A13	26	S	6	R	11	R	15	I	22	I	34	S
14	A14	25	S	6	R	12	I	16	I	22	I	35	S
15	A15	26	S	6	R	12	I	17	I	23	I	34	S
16	A16	26	S	7	R	12	I	16	I	22	I	33	S
17	A17	25	S	6	R	11	R	15	I	23	I	34	S
18	A18	25	S	7	R	13	I	17	I	23	I	34	S
19	A19	25	S	7	R	12	I	18	I	22	I	34	S
20	A20	27	S	6	R	12	I	18	I	23	I	35	S
21	C1	24	I	9	R	13	I	18	I	24	I	33	S
22	C2	27	S	8	R	13	I	17	I	22	I	33	S
23	C3	25	S	7	R	12	I	16	I	22	I	29	S
24	C4	25	S	7	R	11	R	16	I	23	I	31	S
25	C5	25	S	9	R	11	R	16	I	24	I	29	S
26	C6	27	S	9	R	13	I	17	I	23	I	30	S
27	C7	24	I	8	R	11	R	16	I	23	I	32	S
28	C8	26	S	7	R	13	I	17	I	24	I	32	S
29	C9	24	I	8	R	12	I	15	I	23	I	33	S
30	C10	25	S	8	R	13	I	18	I	23	I	32	S
31	C11	26	S	9	R	11	R	17	I	22	I	30	S
32	C12	25	S	7	R	12	I	18	I	23	I	32	S
33	C13	24	I	7	R	12	I	17	I	24	I	30	S
34	C14	27	S	7	R	11	R	18	I	23	I	32	S
35	C15	26	S	9	R	12	I	18	I	24	I	32	S
36	C16	25	S	9	R	13	I	15	I	24	I	29	S
37	C17	25	S	8	R	11	R	15	I	23	I	29	S
38	C18	26	S	8	R	13	I	16	I	24	I	29	S
39	C19	25	S	7	R	13	I	16	I	22	I	33	S
40	C20	24	I	9	R	13	I	15	I	23	I	33	S

R: Resistente; I: Intermedio; S: Susceptible; C: Carne; A: Agua; P.C: Puntos de Corte; T: Tratamientos

Hammerum y Heuer, (2009), encontraron resistencia del 15% de *Escherichia* a Ciprofloxacina (5µg), en muestras obtenidas de carne de aves importadas a Dinamarca, al igual que las muestras obtenidas en nuestra investigación en muestras de carne, las que presentaron una Susceptibilidad del 80%.

Como podemos observar en la tabla 43, el tratamiento T1, presentó un 100% de resistencia a Ciprofloxacina. El resultado obtenido de la actividad antimicrobiana se puede explicar acotando que el tratamiento que presentó resistencia al fármaco, se trataba de la dilución con menor concentración de Ciprofloxacina (1 µg), por lo que podemos expresar que la concentración de este tratamiento no fue la

requerida para producir una inhibición total o parcial del crecimiento de *Escherichia spp.*

Para el tratamiento T2, con una dilución de fármaco de 2 µg se pudo observar que se presentó un resultado particular, en el que la mayoría de los aislados presentaron una inhibición parcial del crecimiento bacteriano; por lo que podemos enunciar que la concentración del fármaco al 2 µg es suficiente para producir la inhibición bacteriana por parte del fármaco en estudio.

Por otro lado, el tratamiento T0 T3 y T4 (3 µg, 4 µg y 5 µg), cumplieron satisfactoriamente su efecto de inhibición total o parcial de *Escherichia* spp., presentando inhibición total (S) o parcial (I), sin presentar ninguna resistencia bacteriana a estas concentraciones de fármaco. Para T4 se observó un efecto variado de actividad antimicrobiana, evidenciándose que gran parte de las muestras presentaron inhibición parcial, mientras que otra parte presento resistencia al fármaco tratado, cabe mencionar que la concentración del fármaco fue menor a la concentración de referencia por lo que podemos observar una inhibición de la bacteria con una dosis más baja que la recomendada. En el caso de T5 (10 µg) se observó una susceptibilidad del 100% a Ciprofloxacina, esto debiéndose a la alta concentración del fármaco.

Tabla 44.
Tabla de frecuencias y porcentajes acerca de la susceptibilidad antimicrobiana de Ciprofloxacina frente a bacterias del género Escherichia spp.

Actividad Antimicrobiana	T0		T1		T2		T3		T4		T5	
	Frec.	%	**Frec.**	%	**Frec.**	%	**Frec.**	%	**Frec.**	%	**Frec.**	%
Resistente (R)	0	0	40	100	10	25	0	0	0	0	0	0
Intermedio (I)	8	20	0	0	30	75	40	100	40	100	0	0
Susceptible (S)	32	80	0	0	0	0	0	0	0	0	40	100
TOTAL	40	100	40	100	40	100	40	100	40	100	40	100

En la tabla 44 se presentan la frecuencias y porcentajes acerca de la susceptibilidad antimicrobiana de Ciprofloxacina frente a aislados de *Escherichia* spp.

Los resultados del tratamiento T1, presentaron un nivel de resistencia del 100% (40/40); el tratamiento T2 presento un 75% de inhibición bacteriana parcial

(30/40), siendo esta la concentración farmacológica mínima de Ciprofloxacina para producir una inhibición bacteriana de *Escherichia*; el T3 presento un 100% de inhibición bacteriana; el T0 presentó un efecto inhibidor del 80% (32/40) de los aislados; el tratamiento T4 presentó un efecto de resistencia del 30% (12/40) de los aislados y 28/40 casos con inhibición intermedia que representaron el 70 %; finalmente, en el tratamiento T5 el 100% (40/40) de los aislados resultaron ser susceptibles a Ciprofloxacina. En la figura 13 se presentan la susceptibilidad antimicrobiana de Ciprofloxacina frente a bacterias del género *Escherichia* spp.

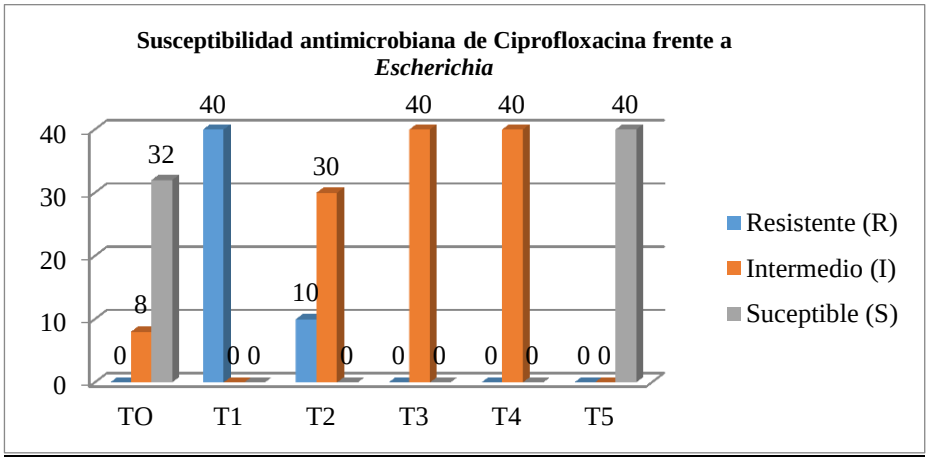


Figura 13. Susceptibilidad antimicrobiana de Ciprofloxacina frente a bacterias del género *Escherichia* spp.

VI. COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS.

Mediante el análisis estadístico realizado sobre los resultados obtenidos en el estudio de las variables propuestas durante esta investigación, y mediante una prueba de Hipótesis mediante chi-cuadrado de Pearson se obtuvieron resultados que expresan que existe evidencia estadística significativa al 95% de confianza para aceptar la hipótesis alternativa y rechazar la hipótesis nula, el límite de la prueba para aceptar la hipótesis nula para 17 grados de libertad fue de 28,86 mientras que nuestro resultado fue de 30,58 lo que nos indica que no entra dentro del rango de la hipótesis nula, por lo que aceptamos la hipótesis alternativa, la misma que nos indica que "La Ciprofloxacina y Estreptomicina presentan efecto inhibitorio en los géneros de *Escherichia* y *Arcobacter*, aislados de agua, carne y queso.."

$\mathbf{H_0}$: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$

$\mathbf{H_1}$: $\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4$ *

Tabla 45.
Tabla de prueba de Hipótesis Chi- cuadrado.

Prueba de Chi-Cuadrado			
	Valor	G.L	Sig. (2-caras)
Pearson Chi-cuadrado	29,587[a]	18	0,169
	32,074	18	0,047
Casos validos	60		

VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 Conclusiones

- Se pudieron reanimar 60 muestras de los géneros *Arcobacter* y *Escherichia* a partir de muestras de quesos, agua y carne de consumo procedentes de investigaciones realizadas por el laboratorio de microbiología de la Universidad Estatal de Bolívar.

- De las 60 muestras de aislados de quesos, agua y carnes que fueron extraídos su ADN, 60 fueron positivos (100%) para bacterias de los géneros *Arcobacter* y *Escherichia* mediante el análisis por PCR.

- Se realizó el estudio de la actividad antimicrobiana de Ciprofloxacina y Estreptomicina mediante la técnica Kirby-Bauer para los cuales pudimos determinar que, para los antibióticos en estudio, el mejor tratamiento fue T5 con una concentración del fármaco del 10 µg, seguido del tratamiento T0 o testigo el cual tuvo una concentración del fármaco del 5 µg, el resultado fue similar tanto para Ciprofloxacina y Estreptomicina contra *Arcobacter* como también contra *Escherichia.*

- Se analizó la susceptibilidad a Ciprofloxacina y Estreptomicina de los géneros *Arcobacter* y *Escherichia* aislados a partir de quesos, agua y carnes obtenidos en investigaciones previas realizadas en el laboratorio de microbiología de la Universidad Estatal de Bolívar, pudimos observar que para el tratamiento (T1) con una concentración mínima de fármaco (1 µg), se exhibió un 100% de resistencia bacteriana por parte de los dos géneros en estudio frente a Estreptomicina y Ciprofloxacina, se demostró que el tratamiento T2 con una concentración de 2 µg, es la mínima concentración de fármaco necesaria para producir una inhibición parcial de la bacteria (10/20 casos); para T0 (testigo), T3 y T4 ningún aislado de *Escherichia* y *Arcobacter* presentó resistencia antimicrobiana a los fármacos en estudio, al igual que T5 (10 µg) al cuál las dos bacterias en estudio fueron susceptibles en su totalidad.

7.2. Recomendaciones.

- El control sanitario de los alimentos que se expenden en la ciudad debería ser más riguroso con el fin de evitar contaminación de los productos de consumo humano que son distribuidos en toda la ciudad

- La implementación de un plan de higiene de los alimentos distribuidos en los mercados debería estar entre las prioridades de Gobierno Autónomo Descentralizado del cantón Guaranda, para asegurar la inocuidad de los alimentos.

- Continuar con la investigación tanto de *Arcobacter* como de *Escherichia*, e identificar el específico tipo de especie de estos dos géneros que está presente en productos para el consumo humano de la ciudad para así poder realizar una clasificación taxonómica completa de estos.

- Realizar investigaciones con terapéutica alternativa con el fin de evitar el uso excesivo de fármacos en el tratamiento de alimentos contaminados.

BIBLIOGRAFIA.

1. **ADZITEY, F., ALI, G., HUDA, N. & TING, S.** (2013). Antibiotic resistance and plasmid profile of *Escherichia coli* isolated from ducks in Penang, Malaysia. *Inter Food Res Jour* 20(3): 1473-1478
2. **ALFARO, M; HURTARTE, A; VALLE, R.** 2014. Implementación de un manual de ordeño higiénico en dos establecimientos lecheros y evaluación de su efectividad mediante análisis microbiológico en el departamento de sonso nate, el salvador. (en línea). S.l., universidad de el salvador, pp: 9-10.
3. **ALMENAR, L.** (2015). Determinación de la calidad higiénico-sanitaria y relación con la presencia de patógenos en moluscos bivalvos (en línea). S.l., universitat politècnica de valència. 17-18 p. Disponibleen https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/39972/tfg laura almenar rivilla v.2.pdf?sequence=1.
4. **ÁLVAREZ, D; GARZA, G; VÁZQUEZ, R.** (2015). Quinolonas. Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. Madrid, España. 24-26 pp.
5. **ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ, D; GARZA-MEYEN.** (2015). Quinolonas. Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. Universidad Anáhuac México Norte. México. 3-4 pp.
6. **BAYAS, F.** (2016). Aportaciones a la epidemiología de *Arcobacter* y *Helicobacter* spp.: aplicación de métodos moleculares a su detección e identificación en alimentos (en línea). S.l., Universidad Politécnica de Valencia.43-44p.
7. **BEARDEN, D; DANZIGER, L.** (2011). Mechanism of action and resistance to quinolones. P*harmacoyherapy*;2(12) 45-46
8. **BRANDL, M. T.** (2016). Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. Annual Review of Phytopathology 44:367-392.

9. **BRYAN A, YOUNGSTER I, MCADAM AJ.** (2015). Shiga Toxin Producing Escherichia coli. Clin Lab Med. 2015 Jun;35(2):247-72. doi: 10.1016/j.cll.2015.02.004.
10. **CAGNACCI, S; GUALCO, L; DEBBIA, M; SCHITO, G; MARCHESE, A.** (2018). European Emergence of Ciprofloxacin-Resistant Escherichia coli Clonal Groups O25:H4-ST 131 and O15:K52:H1. Journal of Clinical Microbiology Aug 2018, 46 (8) 2605-2612; DOI: 10.1128/JCM.00640-08.
11. **CALVO, G., ARIAS, M.L., FERNÁNDES, H.** (2013). *Arcobacter*: un patógeno emergente de origen alimentario. *Archivos Lat. Nutr*, 63 (2): 164-172.
12. **CAMPOS, J.** (2014). Estudio higiénico-sanitario de comedores escolares de la isla de tenerife (en línea). S.l., universidad de la laguna. 40-41 p. Disponible en ftp://tesis.bbtk.ull.es/ccppytec/cp119.pdf.
13. **CERVENKA, L.** (2017). Survival and Inactivation of *Arcobacter* spp., a current status and future prospect. *Crit. Rev. Microbiol.* 2017. 33: 101-108.
14. **COLLADO L, FIGUERAS M J.** (2014). Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. *Clin Microbiol Rev*. 2011; 24: 174-92.
15. **COMISIÓN DEL CODEX ALIMENTARIUS.** 2014. Perfil de riesgos para *Escherichia Coli* enterohemorrágica, incluida la identificación de los productos básicos de interés, entre ellos las semillas germinadas y la carne molida de res y puerco.
16. **CUNHA, B.** (2011) Antibiotic side effects.*Med Clin North Am*;85(1):149-85.
17. **DALHOFF A, SCHMITZ J.** (2013). In vitro antibacterial activity and pharmacodynamics of new quinolones. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.;22(4):203-21.
18. **DAVIS R.** (2016). Ciprofloxacin: an update review of its pharmacology, therapeutic efficacy and tolerability. *Drugs*; 51:1019-34.
19. **DECK D Y WINSTON L** (2017). «Chapter 47. Antimycobacterial Drugs». Basic & Clinical Pharmacology (9 edición). McGraw-Hill.

20. **DENIS, M., REFRÉGIER-PETTON, J., LAISNEY, M. J., ERMEL, G., SALVAT, G.** (2012). *Campylobacter* contamination in french chicken production from farm to consumers. Use of a PCR assay for detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli. J. Appl. Microbiol*, 91 (2): 255-267.
21. **DOUIDAH L, DE ZUTTER L, VANDAMME P& HOUF K.** (2015) Identification of five human and mammal associated Arcobacter species by novel Multiplex-PCR assay. *J. Microbiol. Meth*. 281-286.
22. **EKMAN, E. (**2014). Natural and experimental infections with Flavobacterium psychropilum in salmonid fish. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala. Stockholm. 45-46 pp.
23. **FALAGAS ME, RAFAILIDIS PI, ROSMARAKIS ES.** (2017) Arrhythmias associated with fluoroquinolone therapy. *International J Antimicrobial Agents*; 29(4):374-9.
24. **FANELLI, F. DI PINTO, A. MOTTOLA, A. MULE, G. CHIEFFI, D. BARUZZI, F. TANTILLO, G. & FUSCO, V.** (2019) Genomic Characterization of *Arcobacter butzleri* isolated from shellfish: Novel Insight into Antibiotic resistance and Virulence Determinants. *Front. Microbiol*. 10:670. doi: 10.3389/fmicb.2019.00670.
25. **FAO; OPS.** (2017). Panorama de la seguridad alimentaria y nutricional (en línea). S.l., s.e. 1-174 p. Disponible en http://www.fao.org/3/a-i6747s.pdf.
26. **FERA M, MAUGUERI T, GUGLIANDOLO C, LA CAMERA E, LENTINI V, FAVALORO A, BONANNO D, & CARBONE, M.** (2018). Induction and resuscitation of viable nonculturable Arcobacter butzleri cells. *Appl. Environm. Microbiol*. 74: 3266-3268.
27. **FERNÁNDEZ, H., VILLANUEVA, M.P., MANSILLA, I., GONZALEZ, M., LATIF, F.** (2015). *Arcobacter butzleri* and *A. cryaerophilus* in human, animals and food sources, in southern Chile. *Brazilian J. Microbiol*, 46 (1): 145-147.

28. **FERREIRA, S., FRAQUEZA, M., QUEIROZ, J., DOMINGUES, F., OLEASTRO, M.** (2013) Genetic diversity, antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Arcobacter butzleri* isolated from poultry and environment from a Portuguese slaughterhouse. *Int. J. Food Microbiol*, 162 (1): 82-88.
29. **FERREIRA, S; LUÍSA, A; OLEASTROB, M; PEREIRA, L; DOMINGUES; M.** (2019). A Meta-Analytic Perspective on *Arcobacter* spp. Antibiotic resistance. *Jour of Glob Antimicrob Resis* (16): 130-139 pp.
30. **FIGUERAS, M.J, LEVICAN, A., COLLADO, L**. (2012). Updated 16S rRNA-RFLP method for the identification of all currently characterized *Arcobacter* spp. *BMC Microbiol*, 12: 292.
31. **FIGUERAS, MJ, LEVICAN A, PUJOL I, BALLESTER F, RABADA QUILEZ MJ Y GOMEZ-BERTOMEU F.** (2014). A severe case of persistent diarrhoea associated with *Arcobacter cryaerophilus* but attributed to *Campylobacter* sp. and a review of the clinical incidence of *Arcobacter* spp. New microbes new Infect 2: 31–7.
32. **FRANZ, E. AND A. H.C. VAN BRUGGEN. (**2018). Ecology of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* enterica in the primary vegetable production chain. *Critical Reviews in Microbiology*. 34:143-161
33. **FRASER, J. D. & PROFT, T.** (2018) The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunology Reviews.* 225: 226-243.
34. **FREEMAN, A. F. y HOLLAND, S. M.** (2017) Persistent bacterial infections ad primary immune disorders. Current Opinions in Microbiology. 10: 70-75.
35. **GONZÁLEZ, A, & FERRUS, M.** (2015). Study of *Arcobacter* spp. contamination in fresh lettuces detected by different cultural and molecular methods. *Int. J. Food Microbiol*. 145: 311-314.
36. **GRAUKE, L.J., I.T. KUDVA, J.W. YOON, C.W. HUNT, C.J. WILLIAMS AND C.J. HOVDE. (**2014). Gastrointestinal tract location of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminants. *Appl. Environ. Microbiol*. 68:2269-2277.

37. **GUAMAN, J.** (2017). Implementación de un método de extracción de ADN bacteriano para la detección de *Helicobacter pylori* en muestras de heces humana. Tesis de Posgrado, Universidad Estatal de Guayaquil, pp: 81. Obtenido de: http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/26143/1/T-UG-DP-MBM-0057.pdf.
38. **HAMMERUM, A. & HEUER, E.** (2009). Human health hazards from antimicrobial-resistant *Escherichia coli* of animal origin. *Clinical Infectious Diseases, 48*(7), 916-921.ciprofloxacin resistance is common (prevalence in 2006, 24.2%).
39. **HO, H. T. K., LIPMAN, L. J. A. & GAASTRA, W.** (2016) *Arcobacter*, what is known about a potential foodborne pathogenic agent. *Veterinary Microbiology*. 115: 1-13.
40. **HOUF K, DEVRIESE L, DE ZUTTER L, VAN HOOF J, & VANDAMME P**. (2014). Susceptibility of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, and *Arcobacte skirrowii* to Antimicrobial Agents Used in Selective Media. *J. Clin. Microbiol*. 2014. 39: 1654–1656.
41. **HOYDE, C.J., P.R. AUSTIN, K.A. CLOUD, C.J. WILLIAMS AND C.W. HUNT.** (2014). Effect of cattle diet on *Escherichia coli* O157:H7 acid resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3233-3235.
42. **LARA, G.** (2014). Aplicación de métodos moleculares a la detección y tipificación de patógenos alimentarios (Tesis de Doctorado). Universitat Politècnica de València. Valencia, España. 35-26 pp.
43. **LENNETTE, E. H.; SPAULDING, E. H.; TRUANT, J.** (2015). Manual de Microbiología Clínica. Salvat, Barcelona, pp. 437-440.
44. **LINDSAY, J. A.** (2017) Chronic sequelae of foodborne diseases. Emerging Infectious Diseases. 3: 443-452.
45. **LINDSEY, R.L., GARCIA-TOLEDO, L., FASULO, D., GLADNEY, L.M., STROCKBINE, N. (**2017). Multiplex polymerase chain reaction for identification of *Escherichia coli, Escherichia albertii* and Escherichia fergusonii. J. Microbiol. Methods 140, 1–4.

46. **LLOYD, A. L., HENDERSON, T. A., VIGIL, P. D. & MOBLEY, H. L.** (2019) Genomic islands of uropathogenic *Escherichia coli* contributes to virulence. Journal of Bacteriology. 191: 3469-3481.
47. **LOPEZ, O; LEON, J; JIMENEZ, M y CHAIDEZ, C.** Detección y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Salmonella* en agua y suelo agrícola. *Rev. fitotec. mex* 2019, 32(2) [citado 2019-09-03], pp.119-126.
48. **LUZ, P; ROY, V.** (2017). Plan de mejoras técnicas para la manipulación y conservación de alimentos en el mercado municipal san jacinto (cooperativa juan montalvo), S.l., Universidad de Guayaquil, pp: 5-6.
49. **MAINIL, J. G. & DAUBE, G. (**2015) Verotoxigenic Escherichia coli from animals, humans and foods: who's who's? Journal of Applied Microbiology. 98: 1332-1344.
50. **MILESI, S.** (2010). Emerging pathogen Arcobacter spp. In Food Of Animal Origin. Doctoral Program in Animal Nutrition and Food Safety. Università degli Studi di Milano. Milán, Italia. 82-85 pp.
51. **MILLER, W. G., PARKER, C. T., RUBENFIELD, M., MENDZ, G. L. & WÖSTEN, M. M. S. M.** (2017) The complete genome sequence and analysis of the epsilonproteobacterium *Arcobacter butzleri*. *PLOS One*. 12: 1-21.
52. **MONTEALEGRE, A.** (2017). Evaluación microbiológica de los alimentos de origen animal que se expenden en la vía pública del municipio de Jocotenango, Sacatepéquez (Tesis de pregrado). UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA. 29-31 pp.
53. **ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD** (OMS). (2015). Resistencia a los antimicrobianos: una amenaza mundial. Boletín de Medicamentos Esenciales, 28 y 29(1), 1-2 pp.
54. **OTTH L, WILSON M, CANCINO R& FERNÁNDEZ H.** (2014). In vitro susceptibility of *Arcobacter butzleri* to six antimicrobial drugs. *Arch. Med. Vet.* 2014. 36: 207-210.
55. **PALOMINO, J. Y PACHÓN, J.** (2013). Aminoglucósidos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*;21(2): España. 105-15 pp.

56. **PAREDES, V.** (2009). Farmacología Veterinaria II. Universidad Nacional Agraria. Facultad de Ciencia Animal. Managua, Nicaragua. 17.30 pp.
57. **PATHOGENIC ESCHERICHIA COLI NETWORK (PEN).** (2017). Methods for the detection and molecular characterisation of pathogenic E. coli:www.peneurope.eu/images/site/assets/Methods%20for%20Detection%20and%20Molecular%20Characterisation%20of%20Pathogenic%20%20coli.pdf
58. **PATYAL A, RATHORE R, MOHAN H, DHAMA K, & KUMAR A.** (2014). Prevalence of Arcobacter spp. in humans, animals and foods of animal origin including sea food from India. Transbound. Emerg. Dis.. 58: 402-410.
59. **RAHIMI, E.** (2014) Prevalence and antimicrobial resistance of *Arcobacter* species isolated from poultry meat in Iran, *British Poultry Science*, 55:2, 174-180, DOI: 10.1080/00071668.2013.878783.
60. **RÍOS, S; AGUDELO, R; GUTIÉRREZ, L.** (2017). Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano (en línea). *Revista Facultad Nacional de Salud Pública* 35(2):1-12. Doi: https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.v35n2a08.
61. **ROJAS, Z**. (2014). Evaluación de la especificidad de dos métodos moleculares para la identificación de especies pertenecientes al género *Arcobacter* (en línea). S.l., Universidad Austral de Chile. pp: 3-4.
62. **RUIZ, R., NUBIS, Y., MORALES, M y LINDA, M.** (2017). Valoración microbiológica de queso costeño artesanal y evaluación higiénico-locativa de expendios en Córdoba, Colombia. *Rev. Salud Pública*. 19 (3): 311-317.
63. **SEUNG-HEE, R., SEOG-GEE, P., SUNG-MIN C., YOUNG-OK, H, HEE-JIN J. *et al***. (2011). Antimicrobial resistance and resistance genes in Escherichia coli strains isolated from commercial fish and seafood. *Int Jou of Food Microb* (152):1–2. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.003.

64. **SHAH A.A, SALEHA Z, ZUNITA M & MURUGAIYAH M**. (2014). Arcobacter an emerging threat to animals and animal origin food products? *Trends Food Sci. Technol*. 22: 225-236.
65. **SHAKTI, R., RABINDRA, N.** (2015). Prevalence of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* in an Indian teaching hospital and adjoining communities. *Journal of Taibah University Medical Sciences.10* (5). Recuperado desde: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S165836121500044X.
66. S**TEINMULLER, N., L. DEMMA, J.B. BENDER, M. EIDSON AND F.J. ANGULO.** (2016). Outbreaks of enteric disease associated with animal contact: Not just a foodborne problem anymore. Clin. Infect. Dis. 43:1596-1602.
67. **TORTORA, F.** (2016). Introducción a la microbiología. 10ma edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires- Argentina. 2016: 283-292 pp.
68. **ULLOA, M. (**2016). Enfermedades transmitidas por los alimentos en Chile: agentes causantes y factores contribuyentes asociados a brotes ocurridos durante el año 2013 (en línea). S.l., universidad de chile. pp: 3-4.
69. **VANDAMME, P. Y DE LEY, J.** (1991). Proposal for a new family, Campylobacteraceae, *Int. J. System. Bact*, 41 (4): 451-455.
70. **VANDAMME, P., FALSEN, E., ROSSAU, R., HOSTE, B., SEGERS, P., TYTGAT, R., DE LEY, J.** (1991). Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 41 (1): 88-103.
71. **VANDAMME, P., VANCANNEYT, M., POT, B., MELS, L., HOSTE, B., DEWETTINCK, D., VLAES, L., VAN DEN BORRE, C., HIGGINS, R., HOMMEZ, J.** (1992b). Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 42 (3): 344-356.

72. **VANDENBERG, O., HOUF, K., DOUAT, N., VLAES, L., RETORE, P., BUTZLER, J.P., DEDISTE, A.** (2016). Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of non-*jejuni/coli* campylobacters and arcobacters from Belgium. *J. Antimicrob. Chemother*, 57 (5): 908-913.

73. WANG, G., T. ZHAO AND M.P. DOYLE. (2016). Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Appl. Environ. Microbiol*. 62:2567-2570.

ANEXOS

ANEXO N°1

Lugar del experimento.

Mapa del cantón Guaranda



Departamento de Investigación, Laboratorio de biología molecular, perteneciente al centro de Investigación y Desarrollo Bacteriológico.



ANEXO N°2

Datos Quesos.

Arcobacter	Concentración	5		1		2		3		4		10	
muestras	Trat/Rep	Estrep	Cipro	Estrep	Cipro	Estrep	Cipro	Estrep	Cipro	Estrep	Cipro	Estrep	Cipro
1	r1	19	20	4	6	7	5	8	8	13	12	34	32
2	r1	19	21	6	6	8	5	10	9	13	13	30	31
3	r1	20	23	3	6	5	6	8	8	11	12	30	33
4	r1	19	23	6	3	6	5	8	10	13	12	30	33
5	r1	22	23	3	4	7	5	9	10	11	11	32	34
6	r1	19	22	3	5	6	8	9	9	11	12	32	33
7	r1	18	20	3	6	5	6	10	8	13	12	32	31
8	r1	21	18	3	4	5	5	10	9	13	12	32	34
9	r1	21	19	6	5	6	7	8	8	13	11	33	31
10	r1	20	20	5	4	5	8	8	8	13	11	33	32
11	r1	23	18	6	4	6	8	9	10	12	11	31	30
12	r1	22	18	3	4	6	6	9	8	12	12	30	34
13	r1	21	22	5	3	5	7	10	10	12	12	31	32
14	r1	19	23	3	6	7	5	9	8	12	13	32	30
15	r1	21	20	3	5	8	7	8	8	13	12	34	33
16	r1	18	23	3	3	6	7	10	10	13	11	34	31
17	r1	20	21	6	3	8	5	9	8	12	12	30	30
18	r1	20	20	6	6	5	8	8	9	11	13	32	32
19	r1	22	23	4	3	7	6	9	10	12	13	34	34
20	r1	18	23	3	5	7	5	8	9	12	12	30	30

Datos Carnes.

Escherichia	Concentración	5		1		2		3		4		10	
muestras	Trat/Rep	Estrep	Cipro	Estrep	Cipro	Estrep	Cipro	Estrep	Cipro	Estrep	Cipro	Estrep	Cipro
1	r1	19	27	8	7	10	11	11	16	15	24	24	33
2	r1	19	25	8	7	8	11	8	18	14	22	24	35
3	r1	19	26	8	6	10	12	8	15	15	24	27	35
4	r1	19	25	7	7	10	13	9	18	15	24	24	33
5	r1	20	24	8	7	8	12	8	14	17	22	25	35
6	r1	20	26	8	7	8	13	8	18	16	23	26	35
7	r1	20	26	7	6	10	12	10	16	17	23	28	33
8	r1	18	27	8	7	9	12	8	14	17	22	25	34
9	r1	20	26	6	6	8	11	8	14	17	22	30	33
10	r1	20	27	8	7	8	11	8	17	16	24	23	35
11	r1	19	24	5	7	9	13	10	17	16	23	26	34
12	r1	19	24	5	6	8	13	8	14	14	24	25	33
13	r1	20	26	6	6	10	11	9	15	15	22	27	34
14	r1	20	25	6	6	8	12	8	16	16	22	26	35
15	r1	20	26	6	6	10	12	8	17	16	23	22	34
16	r1	19	26	5	7	9	12	9	16	15	22	30	33
17	r1	20	25	5	6	9	11	9	15	14	23	30	34
18	r1	20	25	7	7	10	13	10	17	16	23	25	34
19	r1	18	25	8	7	8	12	8	18	16	22	29	34
20	r1	19	27	7	6	10	12	10	18	16	23	22	35

Datos agua.

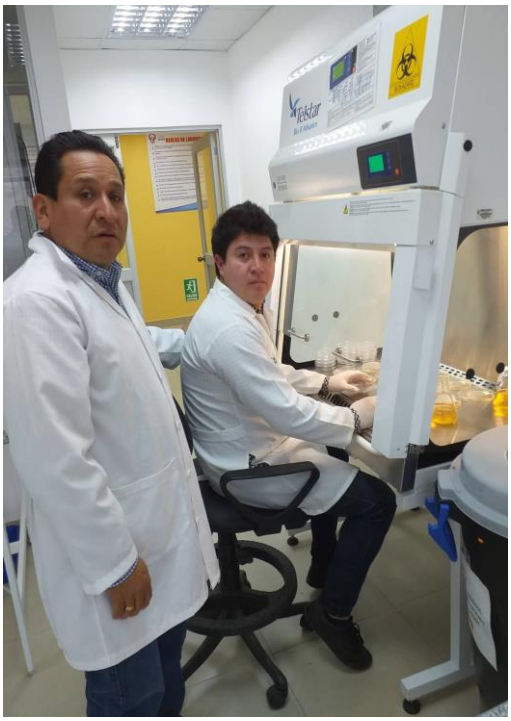
Escherichia	Concentración	5		1		2		3		4		10	
muestras	Trat/Rep	Estrep	Cipro	Estrep	Cipro	Estrep	Cipro	Estrep	Cipro	Estrep	Cipro	Estrep	Cipro
1	r1	22	24	8	9	8	12	11	15	16	24	24	30
2	r1	19	27	8	8	7	11	10	17	17	22	25	31
3	r1	18	25	5	8	10	12	10	14	15	23	24	33
4	r1	21	24	5	7	8	11	9	16	14	24	28	31
5	r1	20	24	5	8	7	13	10	14	15	23	29	29
6	r1	22	25	8	7	9	12	8	18	15	22	27	31
7	r1	20	24	6	8	8	12	9	15	16	23	26	30
8	r1	19	26	5	9	10	13	10	15	14	24	25	31
9	r1	21	26	8	8	10	12	11	18	14	22	28	29
10	r1	19	25	7	7	7	11	8	14	14	23	26	33
11	r1	19	27	8	9	10	13	10	16	16	24	24	30
12	r1	18	27	6	8	8	13	9	18	17	23	29	31
13	r1	20	26	8	7	8	13	10	14	15	24	27	30
14	r1	20	25	5	7	8	13	9	18	17	23	29	32
15	r1	18	26	5	7	9	11	8	17	16	22	24	31
16	r1	20	24	7	8	9	13	9	14	16	24	26	31
17	r1	21	25	7	8	9	12	11	16	17	22	26	29
18	r1	22	26	7	9	8	11	10	15	16	24	28	29
19	r1	19	25	7	9	9	12	8	18	16	23	25	33
20	r1	21	24	5	9	7	13	8	16	14	22	24	29

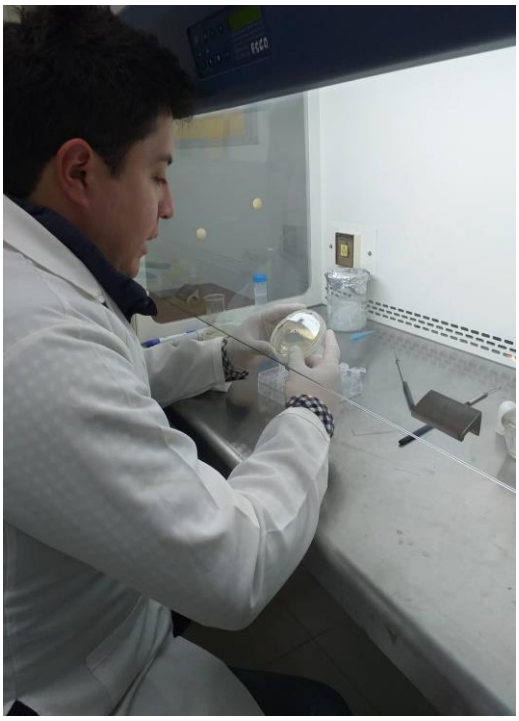
ANEXO N° 3

Evidencia de la fase experimental.









ANEXO N°4

Glosario de términos

PCR: PCR son las siglas por las que se conoce a la reacción en cadena de la polimerasa (en inglés Polymerase Chain Reaction), una técnica científica avanzada que fue inventada por el bioquímico estadounidense Kary Mullis en 1985. Esta técnica permite amplificar pequeñas regiones específicas del ADN en laboratorio, consigue que un pequeño segmento de ADN que pasaría desapercibido en un análisis cualquiera se multiplique millones de veces.

CMI: Es la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de 105 bacterias en 1 mL de medio de cultivo, tras 18-24 h de incubación. Se clasifica la sensibilidad de un germen frente a un antibiótico en función de sus respectivas CMI.

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.

BACTERIA: Las bacterias son microorganismos procariotas que presentan un tamaño de unos pocos micrómetros (por lo general entre 0,5 y 5 μm de longitud) y diversas formas, incluyendo filamentos, esferas (cocos), barras (bacilos), sacacorchos (vibrios) y hélices (espirilos).

ARCOBACTER: *Arcobacter* es un género de bacterias gramnegativas en forma de espiral de la clase Epsilonproteobacteria. Muestra una variedad inusualmente amplia de hábitats, y algunas especies pueden ser patógenos humanos y animales.

ESCHERICHIA: *Escherichia* es un género de bacteria perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Es una bacteria gram negativa, no formadora de esporas, anaerobia facultativa. En aquellas especies que hacen parte de la flora intestinal de los animales de sangre caliente, *Escherichia* provee una porción de su producción de

vitamina K para su huésped. Algunas de estas especies son patógenas. El género lleva este nombre en honor a Theodor Escherich, descubridor de *E.coli*

ANTIBIOTICO: Es una sustancia química producida por un ser vivo o derivado sintético, que mata o impide el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles. Generalmente, son fármacos usados en el tratamiento de infecciones por bacterias, de allí que se les conozca como "antibacterianos".

RESISTENCIA MICROBIANA: Es la capacidad de un microorganismo para resistir los efectos de un antibiótico. La resistencia se produce naturalmente por selección natural a través de mutaciones producidas por azar. Una vez que se genera la información genética, las bacterias pueden transmitir los nuevos genes a través de transferencia horizontal (entre individuos).

VIRULENCIA: La virulencia es el grado de patogenicidad de un serotipo, de una cepa o de una colonia microbiana en un huésped susceptible.

FARMACOCINETICA: Trata de dilucidar qué sucede con un fármaco desde el momento en el que es administrado hasta su total eliminación del cuerpo.

FARMACODINAMIA: Es el estudio de los efectos bioquímicos y fisiológicos de los fármacos y de sus mecanismos de acción y la relación entre la concentración del fármaco y el efecto de este sobre un organismo.

ETAS: Enfermedades transmitidas por alimentos, se definen un incidente en el que dos o más personas presentan una enfermedad semejante después de la ingestión de un mismo alimento, y los análisis epidemiológicos apuntan al alimento como el origen de la enfermedad.

INOCUIDAD ALIMENTARIA: La inocuidad de los alimentos es la ausencia, o niveles seguros y aceptables, de peligro en los alimentos que pueden dañar la salud de los consumidores. Los peligros transmitidos por los alimentos pueden ser de naturaleza microbiológica, química o física y con frecuencia son invisibles a simple vista, bacterias, virus o residuos de pesticidas son algunos ejemplos.

ANEXO N°5

Artículo científico generado en proceso de revisión