



**Análisis de la resistencia fenotípica de *Escherichia coli* aislada de heces fecales de canes con una suplementación probiótica de kéfir de leche, Quito – Ecuador**

Frías Zambrano, Susana Marianela

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

M. Sc. Vargas Verdesoto, Rafael Eduardo

10 de marzo del 2022



Frías\_UIC Copyleaks.docx

Scanned on: 15:7 April 29, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	214
Words with Minor Changes	39
Paraphrased Words	417
Omitted Words	0



Firmado electrónicamente por:  
RAFAEL EDUARDO  
VARGAS VERDESOTO



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Biotecnología**

### **Certificación**

Certifico que el trabajo de integración curricular: “**Análisis de la resistencia fenotípica de *Escherichia coli* aislada de heces fecales de canes con una suplementación probiótica de kéfir de leche, Quito – Ecuador**” fue realizado por la señorita **Frías Zambrano Susana Marianela**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 10 de marzo de 2022



Firmado electrónicamente por:  
RAFAEL EDUARDO  
VARGAS VERDESOTO

**Vargas Verdesoto, Rafael Eduardo**

C. C. 1708200538



## Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

### Carrera de Biotecnología

#### Responsabilidad de Autoría

Yo, **Frías Zambrano Susana Marianela**, con cédula de ciudadanía n° 185035562-7 declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Análisis de la resistencia fenotípica de *Escherichia coli* aislada de heces fecales de canes con una suplementación probiótica de kéfir de leche, Quito – Ecuador** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 10 de marzo de 2022

Firma:

**Frías Zambrano Susana Marianela**

C.C.: 185035562-7



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



## Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

### Carrera de Biotecnología

#### Autorización de publicación

Yo, **Frías Zambrano Susana Marianela**, con cédula de ciudadanía n°185035562-7, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Análisis de la resistencia fenotípica de *Escherichia coli* aislada de heces fecales de canes con una suplementación probiótica de kéfir de leche, Quito – Ecuador** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

**Sangolquí, 10 de marzo de 2022**

Firma

**Frías Zambrano Susana Marianela**

C.C.: 185035562-7

## Dedicatoria

A mi yo del futuro y a todas esas generaciones que vendrán a demostrar que la mejor forma de predecir el futuro es creándolo uno mismo

*Susana Marianela Frías Zambrano*

## **Agradecimientos**

A Dios con su infinita misericordia que estuvo conmigo en cada paso de esta etapa de mi vida, por ayudarme a sentir que siempre estuve completa, que no me faltaba nada y por enviarme a cada una de esas personas que complementaron mi vida.

A mi familia y amigos cercanos por que se que desde donde sea que hayan estado siempre me enviaron sus buenas vibras y confiaron en mi para llegar hasta donde he llegado ahora.

A mi padre que con su sacrificio constante hizo que mi sueño se hiciera realidad y que nunca me faltara nada.

A Andrés por ser mi compañero de batallas, quien siempre ha estado para mi cuando más lo he necesitado, por sus sanos consejos y alientos de ánimo y porque nunca dejó darme por vencida.

A mis amigos Anahí y Jefferson que, aunque no son mis hermanos de sangre si lo son de corazón y me demostraron que siempre voy a poder contar con ellos en las buenas y en las malas.

A Jarvi que, con su amor incondicional, alegría y travesuras a diario me recibía en casa con sus peludos abrazos, cajita de ronroneos y cariños.

Al Ingeniero Rafael Vargas y Karina Ponce por compartirme sus conocimientos y ayuda incondicional, por sus palabras de aliento y sobre todo por darme su voto de confianza.

A todo el grupo de apoyo de Acción Animal que a diario me abrieron sus puertas dando su granito de arena para que este sueño se haga realidad.

***Susana Marianela Frías Zambrano***

## Índice de contenidos

Análisis de la resistencia fenotípica de <i>Escherichia coli</i> aislada de heces fecales de canes con una suplementación probiótica de kéfir de leche, Quito – Ecuador .....	1
Hoja de resultados de la herramienta COPYLEAKS .....	2
Certificación .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Responsabilidad de Autoría .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Autorización.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Dedicatoria .....	6
Agradecimientos .....	7
Índice de contenidos.....	8
Índice de tablas .....	11
Índice de figuras.....	12
Listado de abreviaturas.....	13
Resumen .....	14
Abstract .....	15
Capítulo I: Introducción .....	16
Antecedentes .....	16
Planteamiento del problema .....	18
Justificación del problema .....	20
Objetivos de la investigación .....	23
Objetivo General.....	23
Objetivos Específicos.....	23
Hipótesis .....	23
Capitulo II: Marco Teórico.....	24
Antibióticos y resistencia .....	24
<i>Escherichia coli</i> en el sistema gastrointestinal .....	29
Formas de propagación de <i>E. coli</i> .....	33
Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) .....	34
Mecanismo de transferencia horizontal de genes de resistencia .....	36
Suplementos alimenticios .....	38
Alimentos fermentados .....	38
Métodos para la fermentación de alimentos.....	39
Probióticos en la salud y en la enfermedad gastrointestinal .....	39



Kéfir de leche .....	40
Propiedades organolépticas del kéfir de leche .....	41
Microbiología del kéfir de leche .....	43
Forma de fabricación del kéfir de leche .....	45
Kéfir en la enfermedad y salud gastrointestinal.....	46
Marco legal del kéfir de leche .....	47
Mercado de suplementos alimenticios para animales de compañía .....	48
Mercado de probióticos para animales de compañía .....	50
Sistema digestivo de los perros.....	51
Microbiota intestinal de perros .....	53
Efecto de la dieta probiótica sobre la microbiota intestinal canina .....	54
Medios de cultivo.....	56
Medios selectivos.....	56
Medios diferenciales.....	57
Medios de cultivo utilizados en la presente experimentación .....	57
Agar MacConkey .....	57
Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD) .....	57
Agar Müller-Hinton .....	58
Caldo Nutriente.....	58
Pruebas Bioquímicas.....	58
Indol.....	58
Triple Sugar Iron Agar/ Agar triple azúcar hierro (TSI) .....	59
Capítulo III: Materiales y Métodos.....	60
Zona de estudio .....	61
Obtención de muestra canina.....	61
Trabajo de laboratorio .....	61
Preparación del Kéfir .....	61
Animales y diseño experimental .....	61
Condición corporal.....	63
Muestreo .....	63
Siembra y aislamiento de bacterias.....	64
Identificación de enterobacterias .....	64
Sensibilidad antibiótica .....	64

Análisis estadístico .....	65
Capítulo IV: Resultados .....	66
Animales .....	66
Identificación de enterobacterias .....	66
Sensibilidad antibiótica .....	67
Estadística descriptiva .....	67
Estadística inferencial .....	73
Capítulo V: Discusión .....	76
Capítulo VI: Conclusiones y Recomendaciones .....	83
Conclusiones .....	83
Recomendaciones .....	84
Capítulo VII: Bibliografía .....	85
Capítulo VIII: Anexos .....	107

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Antibióticos para enterobacterias .....	<b>25</b>
<b>Tabla 2.</b> Cepas patogénicas intestinales de <i>E. coli</i> .....	<b>30</b>
<b>Tabla 3.</b> Genes de resistencia revelados por <i>Escherichia coli</i> .....	<b>32</b>
<b>Tabla 4.</b> Composición de los gránulos. ....	<b>41</b>
<b>Tabla 5.</b> Composición química del kéfir de leche. ....	<b>42</b>
<b>Tabla 6.</b> Microorganismos encontrado en el kéfir de leche .....	<b>44</b>
<b>Tabla 7.</b> Composición del kéfir de leche según el Codex Alimentarius (Codex Stan 243-2003).....	<b>47</b>
<b>Tabla 8.</b> Requisitos microbiológicos en leche fermentada según norma NTE INEN 2395:2011 ....	<b>48</b>
<b>Tabla 9.</b> Características de los perros en investigación .....	<b>62</b>
<b>Tabla 10.</b> Antibióticos probados y clases de antibióticos correspondientes al fenotipo de <i>E. coli</i>	<b>65</b>
<b>Tabla 11.</b> Patrones de susceptibilidad por las cefalosporinas de los aislados de las heces fecales de canes. .....	<b>72</b>
<b>Tabla 12.</b> Patrones de susceptibilidad por las $\beta$ – lactamasas, aminoglucósidos, tetraciclinas, fluoroquinolonas, inhibidores de la vía del folato y penicilinas de los aislados de las heces fecales de canes. ....	<b>72</b>
<b>Tabla 13.</b> Test de Duncan de los patrones de susceptibilidad durante el periodo experimental. .	<b>74</b>
<b>Tabla 14.</b> Test de Duncan de número de muestras resistentes por cada antibiótico puesto a prueba. .....	<b>75</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> <i>Rutas de contaminación directa e indirecta de patógenos como E. coli</i> .....	<b>34</b>
<b>Figura 2.</b> <i>Mecanismos de transferencia horizontal de genes de resistencia</i> .....	<b>37</b>
<b>Figura 3.</b> <i>Sistema digestivo de perros</i> .....	<b>52</b>
<b>Figura 4.</b> <i>Tracto gastrointestinal canino y sus microorganismos dominantes.</i> .....	<b>54</b>
<b>Figura 5.</b> <i>Reacción de la prueba del indol</i> .....	<b>59</b>
<b>Figura 6.</b> <i>Evaluación del kéfir de leche en el fenotipo de resistencia de Escherichia coli</i> .....	<b>60</b>
<b>Figura 7.</b> <i>Identificación de Escherichia coli en medios selectivo-diferencial</i> .....	<b>67</b>
<b>Figura 8.</b> <i>Proporciones agrupadas de aislados de resistencia a antibióticos al día 0 en perros por diámetro de inhibición</i> .....	<b>69</b>
<b>Figura 9.</b> <i>Proporciones agrupadas de aislados de resistencia a antibióticos al día 14 en perros por diámetro de inhibición.</i> .....	<b>70</b>
<b>Figura 10.</b> <i>Proporciones agrupadas de aislados de resistencia a antibióticos al día 28 en perros por diámetro de inhibición</i> .....	<b>71</b>
<b>Figura 11.</b> <i>Resistencia fenotípica de Escherichia coli en el periodo experimental.</i> .....	<b>75</b>

### Listado de abreviaturas

**RAM:** Resistencia a los antimicrobianos

**MDR:** Microorganismos multirresistente

**BLEES:** Betalactamasas de espectro extendido

**HGT:** transferencia horizontal de genes

**FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**UFC:** Unidades formadoras de colonias

**gr:** gramos

**mL:** mililitros

**kg:** kilogramos

**MKL:** Agar MacConkey Lactosa

**XLD:** Agar Xilosa Lisina Desoxicolato

**PBP:** Complejo enzimático de síntesis de peptidoglicano

**BAL:** Bacterias ácido-lácticas

## Resumen

En la actualidad los perros se han convertido en reservorios potenciales de la resistencia a los antimicrobianos (RAM), caso que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha declarado como “tratamiento de importancia crítica” debido a que ha traído consigo miles de muertes a nivel mundial por infecciones bacterianas no tratables y que en un futuro muy próximo será una de las causas de mortalidad más importantes por delante del cáncer, por esta razón ha llamado la atención de los diferentes sectores para dar una solución efectiva y rápida a esta problemática, por lo que el presente proyecto de investigación tuvo como objetivo aportar con la idea de suplementar probióticos como kéfir de leche a perros para evaluar su actividad en el fenotipo de resistencia de *Escherichia coli*, bacteria que ha sido vinculada como la especie con mayor gama de resistencia a los diferentes antimicrobianos. Por lo tanto, se suministró 60 mL de kéfir de leche por vía oral a perros adultos sanos (n = 12) por un periodo de 28 días. Las tomas de las heces fecales se realizaron al día 0 o control, sin suplementación de kéfir; día 14 y 28 con suplementación de kéfir. La estadística descriptiva reveló que 2 de los 12 perros al día 0 mostraron un fenotipo de multirresistencia, sin embargo, el Método de Jarlier no reveló la presencia de BLEE; el Blox-Plot y test de comparaciones múltiples de Duncan (valor –  $p < 0,05$ ) mostró que no hubo diferencias significativas en la modulación del fenotipo de resistencia de *E. coli* durante el periodo experimental de todos los antibióticos evaluados (CAZ-30:0,3604;CRO-30:0,1579;CZ-30:0,7033;TE-30:02117;SXT-25:0,1308;AM-10:0,3585). En conclusión, la suministración de kéfir por un periodo de 28 días no mostró efectos clínicamente adversos y además el fenotipo de resistencia de *E. coli* no se vio influenciado por las de bacterias ácido lácticas, marco que nos revela que *E. coli* esta tan adaptada a condiciones desfavorables que puede sobrevivir a cualquier efecto adverso.

*Palabras clave:* kéfir, microbiota intestinal, suplemento probiótico, resistencia a los antimicrobianos

### Abstract

Currently, dogs have become potential reservoirs of antimicrobial resistance (AMR), a case that the World Health Organization (WHO) has declared as "critically important treatment" because it has brought thousands of deaths worldwide due to untreatable bacterial infections and in the very near future will be one of the most important causes of mortality ahead of cancer, For this reason it has called the attention of different sectors to provide an effective and rapid solution to this problem, so this research project aimed to contribute with the idea of supplementing probiotics such as milk kefir to dogs to evaluate their activity in the resistance phenotype of *Escherichia coli*, bacteria that has been linked as the species with the widest range of resistance to different antimicrobials and especially for its easy propagation in different environments and resistance to extreme conditions. Therefore, 60 mL of milk kefir was administered orally to healthy adult dogs (n = 12) for a period of 28 days. Fecal samples were taken at day 0 or control, without kefir supplementation; day 14 and 28 with kefir supplementation. Descriptive statistics revealed that 2 of the 12 dogs at day 0 showed a multiresistance phenotype, however, Jarlier's Method did not reveal the presence of BLEE; Duncan's Box-Plot and multiple comparisons test ( $p$ -value  $<0.05$ ) showed that there was no significant difference in the modulation of the resistance phenotype of *E. coli* during the experimental period for all antibiotics evaluated (CAZ-30:0.3604;CRO-30:0.1579;CZ-30:0.7033;TE-30:0.2117;SXT-25:0.1308;AM-10:0.3585). In conclusion, the supply of kefir for a period of 28 days showed no clinically adverse effects and furthermore the resistance phenotype of *E. coli* was not influenced by those of lactic acid bacteria, which reveals that *E. coli* is so adapted to unfavorable conditions that it can survive any adverse effects.

*Key words:* kéfir, intestinal microbiota, probiotic supplement, antimicrobial resistance.

## Capítulo I: Introducción

### Antecedentes

Desde tiempos remotos los perros han formado parte de las familias con la diferencia que en el pasado se mantenían fuera del hogar y eran destinados a actividades de caza y cuidado de ganado, ahora se han convertido en la prioridad de muchos hogares y el estrecho contacto con los humanos ha dado lugar a una interacción microbiana continua. La velocidad a la que se desarrollan y se propagan las bacterias resistentes a antibióticos ha aumentado de manera exponencial y este fenómeno en animales de compañía como canes ha sido descrito especialmente por programas nacionales de seguimiento de la resistencia a los antimicrobianos como Suecia (SVARM), Noruega (NORM-VET) y Francia (RESAPATH) que han reportado desde 1992, 2002 y 2009, respectivamente (Bourély *et al.*, 2019; Guardabassi *et al.*, 2004). En Ecuador no existen este tipo de programas, pero en investigaciones como la de Ortega-Paredes *et al.*, (2019) y Albán *et al.*, (2020) han reportado la presencia de *E. coli* productoras de BLEE en heces fecales de canes, así como también se sabe del primer caso reportado Ecuador en el 2001 de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo 2 en un paciente que falleció de meningitis postquirúrgica y shock séptico en un hospital de Azogues (Salinas & Jeannete, 2012).

El origen de los probióticos data en la época de los antiguos egipcios y fenicios y culturas orientales, quienes contenían a la leche dentro de botellas hechas de la propia piel o estomago de los animales lecheros, donde la leche entraba en contacto con las bacterias (posiblemente *acidophilus* y *bulgaricus*) y consecuentemente se fermentaba, sin embargo, la primera acentuación de su uso fue descrita a principios de 1900 por Elie Metchnikoff cuando reportó el efecto de microbios en la salud humana, dentro sus investigaciones sobre productos lácteos fermentados el primero en ser descrito fue *bacilo búlgaro* (Gasbarrini *et al.*, 2016).



Por otra parte, la evidencia iconográfica y escrita de algunos manuscritos religiosos de 3000 y 2000 a.C. nombran que el profeta Mahoma dio como obsequio los primeros granos de kéfir a los antepasados de los montañeros del Cáucaso(Aryana & Olson, 2017). El kéfir de leche tradicionalmente se hace con leche de vaca, sin embargo, no se limita al uso de otras fuentes de leche ya sean de cabra, oveja o búfalo; el kéfir desde siempre se ha descrito como una bebida de textura viscosa, sabor agrio y ácido, y con niveles de alcohol bajos(Bourrie *et al.*, 2016). Aunque el kéfir no es tan popular como los demás productos lácteos fermentados a través del tiempo las investigaciones han revelado su potencial no solo en la salud humana si no también en la animal como alimento funcional puesto que tiene características antibacterianas, antifúngicas, anticancerígenas, anti-alérgicas, fortalece el sistema inmunológico, metabolizador del colesterol, cicatriza heridas y mejora el tránsito intestinal(Guzel-Seydim *et al.*, 2021).

En el ámbito veterinario debido a las diferencias que existen con respecto a la microbiota intestinal entre humanos y animales de compañía se ha establecido algunos nichos de mercado que tiene como objetivo la suplementación probiótica, entre ellos kéfir y se han generado varias marcas especialmente extranjeras con diferentes presentaciones como The Honest Kitchen Daily Boosters Instant Goat's Milk, Open Farm Raw Organic Grass-Fed Kefir Topper, Pet Food Raw Cow's Milk Kefir, Coco Love Coconut Kefir for Dogs Nuggets, Champions Choice Natural Kefir y Only Natural Raw Goat Milk Kefir; en el Ecuador no se patentado ninguna marca comercial probiótica para animales de compañía (Metras *et al.*, 2020). Hasta el día de hoy solo existen dos investigaciones que revelan el efecto del kéfir en perros. Uno descrito por Kim *et al.*, (2019) en donde evaluaron el efecto modulador del kéfir de leche en la microbiota intestinal canina y el segundo por Gaspardo *et al.*, (2020) que evaluó la seguridad y facilidad de administración de *Lactobacillus kefir* (bacteria láctica que conforma el 80% del consorcio) en perros sanos y su capacidad para regular la microbiota intestinal con su consecuente secreción de IgA.

## Planteamiento del problema

Los perros en la actualidad son considerados parte del núcleo familiar, en Ecuador 3 de cada 5 familias tienen un perro en su hogar (El Telégrafo, 2022) y a nivel de América Latina somos el continente con mayor masa de mascotas, en el 2017 se notificó que para inicios del 2022 habrá alrededor de 670 millones de mascotas en todo el mundo y que el 45% de ese crecimiento, aproximadamente, 730 millones de mascotas será en América Latina y de esta región el 72%, es decir, 115 millones será del incremento de perros (Carbajo, 2021).

Aun no se puede pronosticar si el incremento de esta masa animal tendrá un hogar o si su destino serán las calles tanto urbanas como rurales. Según el Distrito Metropolitano de Quito en un censo realizado en mayo del 2018 se reveló que hay un perro abandonado por cada 22 habitantes, dichas cifras se han actualizado, puesto que según la Secretaría de Salud y Urbanimal comenta que la crisis sanitaria de Covid-19 no solo deja secuelas en el ámbito de salud si no que ha raíz de la pandemia hubo un aumento de casos de abandono de perros, cifra que pasó a ser de 1 a 10 casos diarios (90%) en abril del 2020, razón por la que en enero de 2021 se decretó la Ordenanza 019 de Bienestar Animal imponiendo una multa de 10 salarios básicos (\$4.000) en el caso de abandono animal (El Comercio, 2019; La Hora, 2021).

El descontrol de este parámetro ha dado lugar a que la interacción humano-animal tanto de manera directa o indirecta sea el perfecto vinculo de propagación de microorganismos resistentes a antimicrobianos (RAM), puesto que son patógenos oportunistas que se acoplan muy fácilmente a los ambientes desfavorables con el fin de propagarse libremente y sobre todo por el hecho de que estos forman parte de la flora normal de la Tierra (Andersen, 2019). Se ha reportado que la mayor fuente de contaminación por estos patógenos ocurre por medio de la vía fecal-oral o por las heces fecales tanto de animales como de humanos, las cuales están expuestas muy fácilmente en los diferentes ambientes

compartidos por hombre y los animales, es decir, fuentes de agua, aire, suelos, alimentos, moscas, manos humanas y fómites (Montealegre *et al.*, 2018; Penakalapati *et al.*, 2017). Estas diferentes interacciones desempeñan un papel muy importante en la transmisión de enfermedades entéricas, especialmente dadas por los diferentes patotipos o fenotipos de resistencia de *E. coli*, las cuales tienen la capacidad de transmitir o recibir horizontalmente los genes de resistencia de las diferentes bacterias que interactúan entre ellas, además, se ha descrito que la vida útil en el medio ambiente de *E. coli* multirresistente o betalactamasas de espectro extendido (BLEES) están entre 2 días a 16 meses (Andersen, 2019), sin embargo, se ha reportado que bacterias multirresistentes se encuentran presentes en cuevas de hace 4 millones de años (Bhullar *et al.*, 2012), en permafrost de 30.000 años de antigüedad (Finley *et al.*, 2013) y en el sistema gastrointestinal de tribus amazónicas que nunca han estado expuestas a antibióticos (Gogarten & Townsend, 2005).

La influencia que han tenido estos patógenos en el ámbito intrahospitalarios ha sido devastador puesto que ha dejado muchas muertes y trastornos fisiológicos nosocomiales (osteomielitis crónica), intestinales (diarrea del viajero), comórbidas (fibromialgia, asma.), de transmisión sexual (VIH), cancerígenos (úlceras pépticas, leucemia), entre otras (Fariñas & Martínez-Martínez, 2013; Galanakis *et al.*, 1997; Geisinger & Isberg, 2017).

En Ecuador el Ministerio de Salud Pública en el año 2015 se unió al sistema de vigilancia y monitoreo para contrarrestar la RAM, plan adoptado en la 68ª Asamblea de la Organización Mundial de la Salud (OMS) instaurando en el Sistema de Salud Pública un Plan Nacional de prevención y control de la resistencia antimicrobiana (RAM) 2019-2023 (Ministerio de Salud Pública, 2019). Pese a ello, en Ecuador hasta la actualidad no existe un dato que evidencie el consumo de antibióticos utilizados en trastornos fisiológicos tanto en el ámbito de la salud humana como animal (OPS, 2021).

Sin embargo, este no es el hecho más importante si no que la falta de regularización, uso excesivo, mala práctica sanitaria y la autoadministración de antibióticos tanto en el ámbito humano como veterinario ha dado paso a que la diseminación y adquisición de los diferentes genes de resistencia se de exponencialmente y que de ello este fenómeno sea ahora de gran impacto clínico, epidemiológico y microbiológico. Es por esta razón que se debe poner en marcha el mayor control por parte de los diferentes programas de administración de antibióticos o antimicrobianos y sobre todo el apego científico al desarrollo de investigaciones que aporten al control y disminución de la resistencia a antibióticos en donde también se pueda evaluar con mayor profundidad la opción del uso de probióticos como kéfir de leche para combatir esta problemática.

### **Justificación del problema**

Una de las mayores amenazas que afronta la humanidad es la propagación de bacterias resistentes a los antibióticos, agentes oportunistas responsables de muchas de las infecciones intrahospitalarias que provocan la muerte o dejan secuelas graves en los pacientes internados. Se han reportado 700.000 muertes al año en todo el mundo por causa de las llamadas “superbacterias” que son microorganismos que se hacen resistentes a los tratamientos antibióticos que hay para combatirlos, se pronostica que esta cifra aumentará a 10 millones en el 2050 si no se toman medidas, por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró a la resistencia a los antimicrobianos (RAM) como un problema global de primer orden (Finisterra *et al.*, 2021). Desde la década de 1940 los antibióticos también se han utilizado en gran medida en los animales, tanto de manera terapéutica como no terapéutica (Rhys-Davies & Ogden, 2020).

Las investigaciones del uso de antibióticos en la medicina veterinaria se han enfocado sobre todo en la industria ganadera, utilizados especialmente como agentes promotores del crecimiento y profilácticos (Casewell *et al.*, 2003) , sin embargo, debido al vinculo que se ha generado entre los

animales de compañía y el humano, el especial cuidado y la mayor atención se ha centrado en ellos y los veterinarios que trabajan para animales pequeños han podido contar con una mayor fuente económica para el análisis de laboratorio y la terapia antimicrobiana, pero esta situación ha dado lugar que de cierta manera la prescripción de antimicrobianos se lleve a cabo con un tratamiento empírico inadecuado. Entre las infecciones más comunes en los animales de compañía se encuentran las infecciones gastrointestinales y por lo general son tratadas con antibióticos de manera prolongada y repetida (Guardabassi *et al.*, 2004) y no es solo el hecho de que los antibióticos se usen sin regularización en estos casos sino que la resistencia a los antimicrobianos se ha dado ya como un proceso de evolución natural y se han generado cepas multirresistentes que han ejercido una presión selectiva en las poblaciones bacterianas por el uso excesivo e inapropiado de antibióticos (Rhys-Davies & Ogden, 2020).

Por ejemplo, *Escherichia coli* al ser un microorganismo oportunista con respecto a la evolución se ha adaptado de tal manera que ha adquirido elementos genéticos o mutaciones que funcionan como factores de virulencia y aptitud, los que se expresan por medio de elementos genéticos móviles como transposones, integrones o plásmidos que codifican para genes de resistencia a varios antibióticos como sulfonamida (sul1 y sul2), aminoglucósidos (chuA y ratA) (Abdelhalim *et al.*, 2020), fluoroquinolonas (Gyr A, Gyr B, parC y parE) (Adamus-Białek *et al.*, 2018), quinolonas (qnrA, qnrB y qnrS), fosfomicina (fosA, fosC2 y fosA3) (Düzgün *et al.*, 2019), estreptomycin (strA, strB y aadA2), y a tetraciclina (tet(A) y tet(B)) (Guardabassi *et al.*, 2004; Lanz *et al.*, 2003), actividades con las que se han podido propagar en diferentes ambientes y medios; por otra parte, varias investigaciones han reportado la presencia *Escherichia coli* multirresistente en heces fecales de canes con resistencia a  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE),  $\beta$ -lactamasas AmpC mediadas por plásmidos (pAmpCs), carbapenémicos y a las fosfoetanolamina transferasas (resistencia a la colistina móvil, mcr) (Guerra *et al.*, 2014; Ortega-Paredes *et al.*, 2019; Procter *et al.*, 2014; P. L. C. Zhang *et al.*, 2018).

Estos datos han sido alarmantes porque hasta la actualidad no se ha podido revelar cual es la fuente y consecuente transmisión de la RAM, solo se cuenta con el hecho de que es una transmisión de ir y venir entre humanos y animales; se revelo un dato en que la tasa de transmisión de perro a humano de *Escherichia coli* multirresistente (MDR) es del 8,8% y desde entonces sin duda ha ido en aumento (Harada *et al.*, 2012)

Razón por lo que el control y prevención de los diferentes vehículos de transmisión de RAM es de vital importancia; sobre todo con aquellos de interacción directa con los humanos como el caso de las mascotas, especialmente perros que en las últimas décadas la convivencia directa o indirecta entre estas dos especies ha crecido exponencialmente, tanto al acariciar, tocar, lamer y frecuentar sitios comunes que es lo que ha proveído las condiciones favorables para la transmisión bacteriana (Bourély *et al.*, 2019).

El kéfir de leche es un potente probiótico capaz de regular el tránsito intestinal, desplazando los patógenos intestinales, mejorando su respuesta inmune y produciendo algunas sustancias antimicrobianas como ácidos grasos, ácido láctico y ácido acético (Saarela *et al.*, 2000). Este probiótico contiene más de 50 especies de microorganismos, incluidas levaduras y bacterias ácido lácticas y ácido acéticas (Kim *et al.*, 2019). El kéfir de leche está conformado en mayor porcentaje por *Lactobacillus*, *L. kefir* conforma el 80% del consorcio, cepa que ha demostrado un poder de adherencia a las células caco-2 e inhibe la adherencia de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* O157:H7 (A. a. Hugo *et al.*, 2008; A. Santos *et al.*, 2003). Otras especies de *Lactobacillus* derivadas del kéfir como *L. acidophilus* y *L. kefiranofaciens*, como también cepas de *S. thermophilus* han revelado actividad antimicrobiana contra toda una gama de organismos patógenos, incluyendo *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. flexneri*, *P. aeruginosae* y *Y. enterocolitica* (Golowczyc *et al.*, 2008; A. a. Hugo *et al.*, 2008; A. Santos *et al.*, 2003; Yüsekdağ *et al.*, 2004).

## **Objetivos de la investigación**

### ***Objetivo General***

Analizar la resistencia fenotípica de *Escherichia coli* aislada de heces fecales de canes por una suplementación probiótica a partir de kéfir de leche.

### ***Objetivos Específicos***

- Elaborar kéfir de leche a partir de nódulos comerciales y leche entera para la suplementación probiótica a canes.
- Aislar las bacterias en un medio selectivo diferencial para enterobacterias desde muestras de heces fecales de canes.
- Identificar las enterobacterias aisladas de muestras de heces fecales de canes por medio de pruebas bioquímicas.
- Realizar un ensayo de sensibilidad antibiótica de los aislados bacterianos con el uso del método Kirby Bauer.

### **Hipótesis**

La suplementación de kéfir de leche en la dieta de canes influye en el fenotipo de resistencia de *Escherichia coli* aislada de heces fecales de canes en comparación con la dieta sin suplementación de kéfir de leche.

## Capítulo II: Marco Teórico

### Antibióticos y resistencia

Los antibióticos son medicamentos con metabolitos naturales de microorganismos como hongos, actinomicetos y bacterias que los secretan con el fin de supervivencia y persistencia en el huésped y la clínica farmacéutica se ha aprovechado de estas características para tratar infecciones causadas por microorganismos patógenos. El primer antimicrobiano hecho fármaco fue la penicilina descrita por Sir Alexander Fleming en 1928 y a partir allí hubo la motivación de muchos científicos en la búsqueda de compuestos naturales capaces de combatir múltiples infecciones que hasta la actualidad se usan (ur Rahman *et al.*, 2018).

Con el avance de la tecnología y por la dificultad de obtención de estos metabolitos naturales se ha visto la necesidad de producir medicamentos semisintéticos diseñados químicamente en laboratorios como las sulfonamidas y las quinolonas (Normark & Normark, 2002).

La manera de clasificar los antimicrobianos, según, Samaha-Kfoury & Araj, (2003) son tres:

- Estructura química
- Sitio objetivo de los medicamentos
- Impacto del resultado final en el objetivo

Los mecanismos de acción de los antimicrobianos, según, Samaha-Kfoury & Araj, (2003) son cinco:

- Inhibición de la síntesis de la pared celular (penicilinas, monobactams, carbapenems y bacitracina)
- Inhibición de la membrana citoplasmática (polimixinas)



- Inhibición de la síntesis de proteínas bacterianas (cloranfenicol, lincosamidas, macrólidos, aminoglucósidos, tetraciclina, etc.)
- Bloqueador de la síntesis de ácidos nucleicos (quinolonas, nitroimidazoles y rifampicina)
- Bloqueador de la síntesis de ácido fólico (sulfonamidas, trimetoprima, etc.)

Las formas de interpretación de los antimicrobianos de acuerdo con la probabilidad del éxito o del fracaso terapéutico, según, Cantón, (2010) son:

- **Sensible:** cuando la probabilidad de éxito terapéutico es alta debido a que el antimicrobiano inhibe con éxito el aislado bacteriano.
- **Intermedio:** cuando el efecto terapéutico es incierto debido a que el antimicrobiano no inhibe por completo el aislado bacteriano.
- **Resistente:** cuando la probabilidad de fracaso terapéutico es alta debido a que el antimicrobiano no inhibe el aislado bacteriano.

**Tabla 1.**

*Antibióticos para enterobacterias*

Familia de antibióticos	Características	Principales grupos	Referencia
$\beta$ -lactámicos	Es un bactericida que es capaz de producir la lisis celular debido a la capacidad de inhibir la síntesis y degradar (por enzimas líticos o autolisinas) la pared celular bacteriana y del peptidoglicano, el cual proporciona rigidez y protección a la alta presión osmótica interna. El 50% de todos los	Penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, carbapenems, monobactams e inhibidores de la $\beta$ -lactamasa	(Calvo & Martínez-Martínez, 2009; Davey <i>et al.</i> , 2015)

Familia de antibióticos	Características	Principales grupos	Referencia
Cefalosporinas	<p>antimicrobianos prescritos pertenecen a este grupo. La producción de betalactamasas que se hidrolizan inactivan su función.</p> <p>Producen la muerte del ente patógeno por lisis microbiana, este a través de la proteína fijadora de penicilina (PBP) produce la inactivación de los inhibidores de la autolisina endógena la que tiene la capacidad de romper las paredes celulares de los microorganismos y consecuentemente mueren.</p>	<p><i>Primera generación:</i> cefazolina, cefalotina</p> <p><i>Segunda generación:</i> cefuroxima, cefoxitinaa, cefotetána, cefaclor, cefamandol</p> <p><i>Tercera generación:</i> cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefixima, cefpodoxima</p>	<p>(Mella M et al., 2001; Rivas et al., 2002)</p>
Aminoglucósidos	<p>Se caracterizan por ser bactericidas rápidos, no son metabolizados por los organismos y además muy pocos se unen a las proteínas plasmáticas. Su actividad se da sobre ciertas porciones del Mrna de las células procarióticas el cual tiene la capacidad de evitar la síntesis proteica por la acción directa al ribosoma (30S y 50S), lo cual produce fallas en la lectura del código genético causando una síntesis proteica anormal o disminuida. Por otra parte también tiene la capacidad de desplazar el Mg<sup>2+</sup> y el Ca<sup>2+</sup> de la membrana</p>	<p>Estreptomina, gentamicina, tobramicina, amikacina, netilmicina, neomicina</p>	<p>(M. Rodríguez, 2002)</p>

Familia de antibióticos	Características	Principales grupos	Referencia
	<p>citoplasmática interfiriendo en su integridad puesto que puede producir aberturas en la pared celular con su consecuente alteración del gradiente electroquímico lo que causa un debilitamiento bacteriano (↑ gradiente electroquímico ↑ actividad antimicrobiana)</p>		
Tetraciclinas	<p>Se caracterizan por ser antibióticos bacteriostáticos de amplio espectro. Su eficacia se da sobre todo en gramnegativos y muy pocos para grampositivos, tanto aerobios como anaerobios. Su actividad se ejerce al alcanzar el ribosoma de las gramnegativas por transporte activo los cuales al llegar se unen de forma reversible a los receptores de la subunidad 30S y bloquean la fijación del aminoacil-Trna al sitio aceptor en el complejo Mrna-ribosoma lo que provoca que no se de una nueva incorporación de aminoácidos a la cadena peptídica en crecimiento, evitando la síntesis de proteínas.</p>	Clortetraciclina, oxitetraciclina, doxiciclina, minociclina, tetraciclina.	(Mendoza & Campos, 2008)
Fluoroquinolonas	<p>Son bactericidas sintéticos de amplio espectro que tienen baja afinidad por proteínas plasmáticas (13-30%). Ejerce su actividad directamente sobre ADN girasa de gramnegativos y la</p>	Norfloxacin, enoxacin, ciprofloxacina, ofloxacina, amifloxacina,	(Leyva & Leyva, 2008; C. Rodríguez & Obrador, 2020)

Familia de antibióticos	Características	Principales grupos	Referencia
	<p>topoisomerasa IV de los grampositivos, estas proteínas son responsables de los procesos replicación, transcripción y reparación del ADN bacteriano, es decir, del enrollamiento, ruptura y ensamblaje de ADN por lo que una inhibición de estas funciones produce directamente la muerte celular.</p>	<p>enoxacina, levofloxacino, moxifloxacino.</p>	
<p>Inhibidores de la vía del folato</p>	<p>Son considerados como bacteriostáticos capaces de bloquear la síntesis de factores metabólicos del microorganismo. Usualmente en la síntesis de ácido fólico por competencia contra el ácido p-amino benzoico en bacterias susceptibles, también suelen inhibir la dhidroteroato sintetasa, enzima responsable de incorporar PABA al ácido dihidroteróico precursor del ácido fólico.</p> <p>Folatos: su síntesis, metabolismo, transporte y su papel en el desarrollo de plantas</p>	<p>Trimetoprima sulfametoxazol, sulfisoxazol, suladiazina, sulfacetamida.</p>	<p>(Calvo &amp; Martínez-Martínez, 2009; Reyes <i>et al.</i>, 2015)</p>
<p>Penicilinas</p>	<p>Se caracterizan por ser un bactericida que tiene como función evitar la síntesis de la pared celular al inhibir la enzima transpeptidasa que es la responsable de la formación del peptidoglicano. También impiden la división y el crecimiento de los microorganismos</p>	<p>Penicilina G Penicilina V Ampicilina Amoxicilina Meticilina Nafcilina Carbenicilina</p>	<p>(Alpizar Olivares, 2000; R. Rodríguez, 2017)</p>

Familia de antibióticos	Características	Principales grupos	Referencia
	susceptibles al producir su lisis y deformamiento.		

Con la llegada de la penicilina a la humanidad, se creó un ambiente optimista en el que se creía que se había acabado la era de los insectos y patógenos, sin embargo, el brote de nuevas infecciones dio paso a que la penicilina ya no surgiera efecto debido a la capacidad que tienen los microorganismos para adquirir resistencia antibiótica, debido a este fenómeno los científicos se vieron en la obligación de la búsqueda de nuevas fuentes antibióticas que combatieran la resistencia y así fue como surgieron antibióticos de segunda, tercera y una cuarta generación, pero el oleaje de resistencia nunca a cesado y los microorganismos han hecho de la resistencia un proceso de evolución natural de tal forma que se han vuelto multirresistentes, es decir, un solo microorganismo puede ser resistente a múltiples familias de antibióticos. Se revela resistencia no solo cuando un antibiótico deja de ser efectivo si no también cuando los patógenos sobreviven a dosis mas altas del permisible(ur Rahman *et al.*, 2018).

### ***Escherichia coli* en el sistema gastrointestinal**

*Escherichia coli* es una bacteria gram negativa perteneciente a la familia de *Enterobacterias* y comúnmente siendo el bacilo más estudiado en el mundo, de hecho, es la primera bacteria en colonizar el intestino de mamíferos inmediatamente al nacer, por lo que usualmente es la causante de infecciones del tracto gastrointestinal pero también ayuda al correcto funcionamiento del proceso digestivo(Puvača & de Llanos Frutos, 2021). Al ser un microorganismo oportunista con respecto a la evolución se ha adaptado de tal manera que ha adquirido elementos genéticos o mutaciones que funcionan como factores de virulencia y aptitud por lo que esta bacteria consta en la lista de la Organización Mundial de

la Salud (OMS) que contiene 12 familias de bacterias que son un peligro para la salud humana (Tagliabue & Rappuoli, 2018)

La influencia *E. coli* en la vida animal tiene alta transcendencia no solo porque vive dentro de los mamíferos y porque puede propagarse fácilmente, si no también, porque es el reservorio más importante de genes de resistencia (codificados cromosómicamente o mediados por plásmidos) y ha demostrado que al estar en contacto con otras bacterias esta puede transmitir horizontalmente sus rasgos resistentes a la genética de otros microorganismos que comparten el mismo entorno, así como también adquirirlo de ellos (Card *et al.*, 2017; Puvača & de Llanos Frutos, 2021; Tagliabue & Rappuoli, 2018).

**Tabla 2.**

*Cepas patogénicas intestinales de E. coli*

Patotipos	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC)	Causa diarrea en humanos, monos, conejos, perros y ovejas por su capacidad de adherirse a la mucosa intestinal utilizando una proteína intimina y una adhesina, no secreta toxinas termoestables (ST) ni termolábiles (LT) su finalidad es destruir las microvellosidades intestinales.  La presencia o ausencia del plásmido de factor de adherencia la subclasifica en típica y atípica.	(Mirsepasi-Lauridsen <i>et al.</i> , 2019; Teixeira <i>et al.</i> , 2015)
<i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	Se adhiere a los enterocitos y secreta toxinas como la enterotoxina resistente al calor (ST) y la enterotoxina termolábil (LT) mediante fimbrias o pili de distinto tipo lo que produce una alta concentración de AMP cíclico aumentando la	(Nataro & Kaper, 1998)

Patotipos	Descripción	Referencia
	secreción de calcio por las células criptales y la inhibición de la reabsorción de cloruro de sodio por las microvellosidades por lo que causa una deshidratación muy fuerte, dando como cuadro clínico la conocida diarrea del viajero.	
<i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	Causa diarrea sanguinolenta en niños y adultos, es un de las <i>E.coli</i> que causa mas daño por su capacidad de invasión al epitelio intestinal, no fermenta lactosa; tiene la capacidad de liberar calcio en altas cantidades impidiendo la solidificación ósea, causando artritis y en algunos casos arterioesclerosis.	(Nataro & Kaper, 1998; Vidal <i>et al.</i> , 2007)
<i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC)	Causa diarrea acuosa sin fiebre y producen toxinas como la termoestable enteroagregante (EAST) y la toxina codificada por 31recimien (PET). La procedencia de su nombre se debe a que sus fibrinas son capaces de aglutinar las células de los tejidos. Se ha descrito una cepa compuesta llamada <i>E. coli</i> enteroagregativa hemorrágica (ECEAH) que produce el mismo cuadro clínico pero con hemorragia.	(Nataro & Kaper, 1998; Vidal <i>et al.</i> , 2007)
<i>E. coli</i> productora de toxina Shiga (STEC)	Una persona infectada con STEC puede mostrarse como asintomática o mostrar un cuadro clínico de diarrea, calambres abdominales, vómitos y fiebre y en casos graves puede desarrollar el síndrome urémico hemolítico (SUH) y la colitis hemorrágica (CH). Por otra parte, también puede afectar al sistema nervioso produciendo convulsiones, accidente cerebrovascular y llegar hasta el coma.	(ACHIPIA, 2017; Rípodas Navarro <i>et al.</i> , 2017)

Patotipos	Descripción	Referencia
	Usualmente los animales de granja contienen STEC en su organismo y lo proliferan por medio de sus heces fecales.	
<i>E. coli</i> de adherencia difusa (ADEC)	Este tipo de bacteria se ha descrito como una cepa independiente de los patotipos de <i>E. coli</i> , se ha encontrado en niños de 1 a 5 años y aun no se conoce su manera de proliferación y mecanismo de transmisión. Para difundirse utiliza una fimbria de superficie conocida como F1845. Usualmente causa diarrea aguda sin vestigio de sangre en las heces.	(Riveros <i>et al.</i> , 2011)
<i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	Causa diarrea hemorrágica y usualmente falla renal, es común en niños y ancianos. Una de sus cepas mayor descrita es <i>Escherichia coli</i> O157:H7 causante del brote de diarrea aguda en EEUU y es capaz de secretar toxinas de tipo Shiga (STEC) o verocytotoxina (VTEC)	(Riley <i>et al.</i> , 1983)

**Tabla 3.**

*Genes de resistencia revelados por Escherichia coli*

Resistencia	Genes	Referencia
$\beta$ -lactámicos y aminoglucósidos	chuA y ratA AmpC	(Abdelhalim <i>et al.</i> , 2020)
Tetraciclina	tetA y tetB	(Kilani <i>et al.</i> , 2020)
Sulfonamida	sul1, sul2 y sul3	(Guardabassi <i>et al.</i> , 2004; Lanz <i>et al.</i> , 2003)
Fluoroquinolonas	Gyr A, Gyr B, parC y parE	(Adamus-Białek <i>et al.</i> , 2018)
Estreptomicina	strA, strB y aadA2	(Guardabassi <i>et al.</i> , 2004; Lanz <i>et al.</i> , 2003)
Quinolonas	qnrA, qnrB y qnrS	(Düzgün <i>et al.</i> , 2019)
Fosfomicina	fosA, fosC2 y fosA3	(Düzgün <i>et al.</i> , 2019)

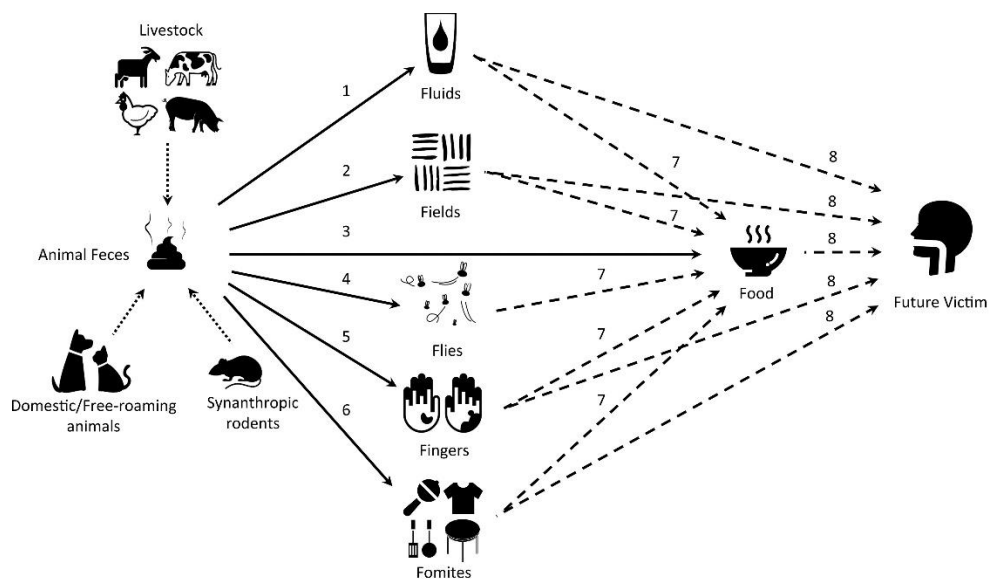


### **Formas de propagación de *E. coli***

Se ha reportado que la mayor fuente de contaminación por estas bacterias viene de las heces fecales de los animales, las cuales están expuestas muy fácilmente tanto a los humanos como a los diferentes animales que merodean sitios contaminados, en la Figura 1 se describen todas las diferentes rutas de contaminación; las principales rutas de contaminación directa son: las fuentes de agua tanto potables, almacenadas, estanques abiertos, subterráneas como superficiales(1); el suelo tanto en hogares como en ambientes públicos(2); los alimentos por la mala manipulación durante los procesos de producción especialmente las vinculadas con el sacrificio y la mala cocción(3); las moscas son potenciales vectores de contaminación y transmisión al estar en contacto directo con desechos tanto orgánicos como inorgánicos(4); las manos humanas por el mal aseo y el continuo tacto con los animales (5) y los fómites como utensilios, aparatos eléctricos, juguetes o muebles están predispuestos a contaminarse muy fácilmente por el contacto directo con animales a medida que los usan o juegan con ellos(6). Por otra parte, las principales rutas de contaminación indirecta son: interacción con los diferentes vehículos como las moscas y manos mal aseadas con los alimentos, productos agrícolas contaminados, agua contaminada para el aseo, lavar o cultivar productos, pies o zapatos con tierra contaminada, fómites contaminados usados como recipientes para la comida (7); contaminación vía fecal-oral (8)(Figura 1) (Penakalapati *et al.*, 2017).

Figura 1.

Rutas de contaminación directa e indirecta de patógenos como *E. coli*



**Nota:** Líneas continuas contaminación directa, líneas discontinuas contaminación indirecta. Tomado de (Penakalapati *et al.*, 2017)

### Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)

Son enzimas que revelan resistencia a todos los antibióticos betalactámicos, tienen la capacidad de hidrolizar oximino-cefalosporina, es decir, cefalosporinas de 3ª y 4ª generación (espectro extendido) y monobactámicos, pero menos a cefamicinas y carbapenémicos. Son susceptibles a  $\beta$ -inhibidores de la lactamasa como al ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Su mecanismo de acción se da cuando hay la producción de  $\beta$ -lactamasa la cual rompe el anillo  $\beta$ -lactámico y hace que el antibiótico sea inactivo antes de que alcance el objetivo de PBP (complejo enzimático de síntesis de peptidoglicano). Su origen data en la década de los 80s por el uso excesivo de cefalosporinas con el fin de tratar enterobacterias patógenas (ur Rahman *et al.*, 2018).

Los mecanismos de resistencia o protección contra los  $\beta$ -lactámicos según Puvača & de Llanos Frutos, (2021) son:

- Producción de  $\beta$ -lactamasas, que producen que los  $\beta$ -lactámicos sean ineficaces
- Inhibición de la penetración de antibióticos en la ubicación prevista
- Modificación de los PBP del sitio de destino
- Activación de bombas de eflujo

Existen diferentes grupos de BLEE debido a los diferentes esquemas de evolución, en el caso de enterobacterias se describen tres grupos:

- **TEM:** se originó por la mutación plasmática de genes clásicos TEM-1 y TEM-2 por sustitución de aminoácidos únicos o múltiples alrededor del sitio activo; son capaces de hidrolizar la penicilina y la cefalosporina de 1ª generación como la cefalorridina y el 90% de las resistencias contra ampicilina se debe a la codificación de estos genes (ur Rahman *et al.*, 2018; Zhao & Hu, 2013).
- **SHV:** se originó a partir de la mutación puntual en SHV-1 debido a la sustitución de glicina por serina en las 238 posiciones, muestra un perfil hidrolítico a cefotaxima y ceftazidima, esta enzima se encuentra principalmente en *K. pneumonia*, han revelado tener genes de resistencia tanto en el plásmido como en el cromosoma (Perilli *et al.*, 2011; ur Rahman *et al.*, 2018).
- **CTX-M:** son cefotaximasas codificadoras de plásmido de rápido crecimiento, pese a que se han descubierto recientemente ya se han reportado 172 variantes con diferente secuencia de aminoácidos y características funcionales. Tiene características de coresistencia, es decir, que junto la presencia de otras enzimas de resistencia se expresa mas notablemente y hace imposible la aplicación de un tratamiento. A

diferencia de las enzimas nombradas estas no surgieron por alteraciones enzimáticas existentes, si no mas bien por la transferencia horizontal de novo de genes de *Kluyvera* spp. (D'Andrea *et al.*, 2013; ur Rahman *et al.*, 2018).

Debido a las características que fueron revelando las BLEE han hecho que la propagación en el medio ambiente y entorno clínico sea muy sencillo, y con ello surgió la dificultad de tratarlos por su difícil detección e inconsistencia en la notificación. Además, las BLEE se han expandido tanto que su material genético de resistencia cambia de acuerdo al entorno geográfico en el que se encuentra y ha ido rondando por el mundo dejando muchas secuelas económicas y vitales(Rice *et al.*, 1990). Las BLEE se han convertido en los principales epicentros de pandemias mundiales debido a que han causado brotes incluso en lugares donde la administración de antibióticos no llegaba, su propagación especialmente de clones y plásmidos se dan en sectores públicos y hospitalarios sobre todo de las familias TEM (TEM-24, TEM-4 y TEM-52), SHV (SHV-5, SHV-12) y CTX-M (CTX-M-9, CTX-M-3, CTX-M-14 o CTX-M-15) comunes en *E. coli* , la cual tiene una alto potencial de causar infecciones intestinales y extraintestinales (Jostins *et al.*, 2012; ur Rahman *et al.*, 2018).

### **Mecanismo de transferencia horizontal de genes de resistencia**

La transferencia horizontal de genes (HGT) es un proceso mediante el cual las bacterias transfieren sus genes proveyendo de nuevas características o rasgos a las diferentes poblaciones bacterianas, que no necesariamente son en una relación padre-descendencia ni provenientes de un mismo ambiente (Khan *et al.*, 2019). Dicho mecanismo es el utilizado para la propagación de los genes de resistencia a los antibióticos, los cuales pueden darse por tres métodos según Levy & Marshall, (2004) :

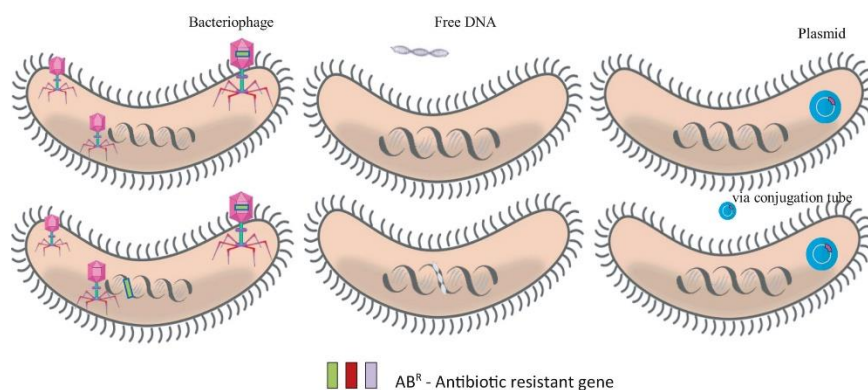
- Por transducción mediante bacteriófagos.

- Por transformación mediante la incorporación de ADN libre en el cromosoma, plásmido o material genético de la bacteria.
- Por conjugación mediante plásmidos, transposones e integrones.

Se ha evidenciado que el método más usado para la transferencia de genes de resistencia es el de conjugación y que esta transferencia usualmente se da entre microorganismos del mismo género, sin embargo, también se ha evidenciado que se da en géneros muy distintos (Evans *et al.*, 2020; Redondo-Salvo *et al.*, 2020).

**Figura 2.**

*Mecanismos de transferencia horizontal de genes de resistencia*



**Nota:** Tomado de (Alekshun & Levy, 2007; Kunhikannan *et al.*, 2021)

Por otra parte, la adquisición de resistencia se puede dar por mecanismos intrínsecos o adquiridos. Los mecanismos intrínsecos hacen referencia aquellos genes adquiridos naturalmente por sistemas cromosómicos y de eflujo del huésped. Por el contrario, los mecanismos adquiridos hacen referencia a aquellas mutaciones que se dan por HGT, dichas mutaciones pueden deberse según Nishita *et al.*, (2017) por:

- La alteración de la proteína por la modificando o eliminando el sitio de unión.

- Inactivación de agentes microbianos por la segregación enzimática.
- Alteración de los canales transmembrana impidiendo la unión o paso del medicamento.
- Expulsión del medicamento mediante bombas de regulación ascendente.

### **Suplementos alimenticios**

Los suplementos alimenticios son complementos alimentarios procesados industrialmente o naturales que al formar parte de la dieta diaria provee al consumidor de beneficios potenciales para la salud más allá de la nutrición básica (Granato *et al.*, 2020).

Dentro de estos suplementos se encuentran los famosos probióticos, prebióticos, simbióticos, paraprobióticos y postbióticos. Los probióticos tienen un efecto directo en el microbiota intestinal mediante la entrega selectiva de cepas bacterianas o de un consorcio de microorganismos beneficiosos para el tracto gastrointestinal; los prebióticos son usualmente utilizados como sustrato o alimento para el crecimiento de los microorganismos beneficiosos pero al mismo tiempo pueden brindarle de beneficios a la salud del huésped como la Inulina de raíces de achicoria, fructooligosacáridos (FOS), isomaltoligosacáridos (IMO) y xilooligosacáridos (XOS), entre otros; los simbióticos son una combinación de los dos por acción sinérgica con el fin de potenciar sus propiedades; los paraprobióticos son probióticos inactivados o muertos por calor y los postbióticos son las sustancias producidas por la actividad metabólica de los microorganismos como enzimas, vitaminas, fenoles, bacteriocinas, ácido láctico, entre otras (Markowiak & Śliżewska, 2017, 2018; Yadav *et al.*, 2022; Żółkiewicz *et al.*, 2020).

### **Alimentos fermentados**

Son alimentos o bebidas producidos a través del crecimiento microbiano controlado, y la conversión de componentes de los alimentos a través de la acción enzimática. Son alimentos que ocupan las recetas principales en las cocinas de casi todas las culturas en el mundo debido a sus múltiples beneficios en la salud humana y especialmente la salud gastrointestinal. Estos productos

contienen al menos  $10^6$  células microbianas por gramo, con concentraciones que varían en función de varias variables, como la región, la edad y el momento en que se consumen los alimentos (Dimidi *et al.*, 2019)

### **Métodos para la fermentación de alimentos**

- **Fermentos silvestres o espontáneos:** la fermentación se da de manera natural por la acción de los microorganismos en alimentos crudos o entorno en procesamiento. Por ejemplo, kimchi y algunos productos de soja(Dimidi *et al.*, 2019; Rezac *et al.*, 2018).
- **Fermentos dependientes del cultivo:** la fermentación comienza con la adición de cultivos iniciadores o previamente fermentado (backslopping) que pueden ser de origen natural o comercial, por ejemplo, kéfir, kombucha y natto(Dimidi *et al.*, 2019; Marco *et al.*, 2017<sup>a</sup>).

### **Probióticos en la salud y en la enfermedad gastrointestinal**

Los probióticos se definen según la FAO y la OMS como “microorganismos vivos estrictamente seleccionados que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped” (Ganguly *et al.*, 2011; Gasbarrini *et al.*, 2016). Su capacidad amortiguadora y protectora contra afecciones intestinales es lo que ha motivado su consumo puesto que se ha reportado que los microorganismos procedentes de los fermentos pueden sobrevivir en el ambiente intestinal (pH bajo, sales biliares, adherencia al moco intestinal) y efectuar su acción regulando el tránsito intestinal, desplazando los patógenos intestinales, mejorando su respuesta inmune, produciendo algunas sustancias antimicrobianas, produciendo péptidos bioactivos que ayudan a la salud cardiovascular, la conversión de compuestos en metabolitos biológicamente activos (ácido láctico a compuestos fenólicos), la reducción de toxinas y antinutrientes (la soja puede reducir el ácido fítico) y el desdoblamiento de carbohidratos a compuestos más simples, lo ayuda a los pacientes intolerantes a fermentos por el síndrome del intestino irritable (Abu-Salem *et al.*, 2014; Derrien & van Hylckama Vlieg,

2015; Dimidi *et al.*, 2019; Filannino *et al.*, 2015; Laatikainen *et al.*, 2016; Marco *et al.*, 2017b; Pessione & Cirrincione, 2016; Salazar *et al.*, 2016; C. Zhang *et al.*, 2016).

### **Kéfir de leche**

El kéfir de leche (la palabra kéfir proviene del eslavo keif que significa “vivir bien” o “bienestar”) es un fermento tradicional originario del Cáucaso, pertenece al tipo de fermentos dependientes de cultivo, puesto que para iniciar su fermentación en leche necesita de los denominados “gránulos de kéfir” que son un consorcio de microorganismos en donde conviven de manera simbiótica más de 50 especies de microorganismos como levaduras fermentadoras de lactosa (por ejemplo, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Debaryomyces hansenii*, etc ), levaduras no fermentadoras de lactosa (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces unisporus* ), bacterias ácido lácticas y ácido acéticas alojadas en una matriz de polisacáridos y proteínas llamada kefiran (la D- glucosa y D – galactosa son responsables de esta conexión) que es soluble en el agua, viscosa y resistente a la hidrólisis enzimática del ambiente intestinal (Kim *et al.*, 2019; Lopitz-Otsoa *et al.*, 2006; Saarela *et al.*, 2000). En la parte exterior de los granos de kéfir se encuentran solamente bacterias, en especial Bacilos, mientras que en la parte interna contiene levaduras y en la interfaz interna y externa una composición mixta en donde se disponen bacterias con filamentos, polisacáridos largos, levaduras y hongos (Rosa *et al.*, 2017<sup>a</sup>). El kéfir de leche está conformado en mayor porcentaje por *Lactobacillus*, *L. kefir* conforma el 80% del consorcio, cepa que ha demostrado un poder de adherencia a las células caco-2 e inhibe la adherencia de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* O157:H7 (Hugo *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2003). Otras especies de *Lactobacillus* derivadas del kéfir como *L. acidophilus* y *L. kefiranofaciens*, como también cepas de *S. thermophilus* han revelado actividad antimicrobiana contra toda una gama de organismos patógenos, incluyendo *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. flexneri*, *P. aeruginosa* y *Y. enterocolitica* (Golowczyc *et al.*, 2008; Hugo *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2003; Yüksekdağ *et al.*, 2004).



### **Propiedades organolépticas del kéfir de leche**

Todas las características que se nombraran a continuación dependen en gran medida de la zona geográfica, tipo y volumen de leche, tiempo y temperatura de fermentación y condiciones de almacenamiento (Rosa *et al.*, 2017).

**Gránulos:** aspecto de coliflor de consistencia irregular, multilobular, gelatinosas, elásticas, coloración beige, viscosa, su diámetro oscila entre 0,3 a 3,5 cm. Su aspecto de debe principalmente por la existencia de *Lactobacillus kefiranofaciens* y *Lactobacillus kefir* (Lopitz-Otsoa *et al.*, 2006; Rezac *et al.*, 2018).

**Fermento:** es una bebida levemente efervescente, ligeramente carbonatada, textura cremosa, sabor y olor agrio o margo (debido a aminos bioactivos como penicilamina y la histamina y ácidos como láctico, acético, pirúvico, propiónico, butírico, etc.), coloración marfil. Los subproductos de fermentación como ácidos acéticos y lácticos, acetaldehídos (generadores de sabor), dióxido de carbono y etanol son los responsables de sus propiedades organolépticas (Rezac *et al.*, 2018).

#### **Tabla 4.**

*Composición de los gránulos.*

<b>Componentes</b>	<b>Contenido</b>
Grasa	4,4%
Cenizas	12,1%
Mucopolisacáridos	45,7 %
Proteína total	34,3 %
Proteínas insolubles	27 %
Proteínas solubles	1,6 %
Aminoácidos libres	5,5 %
Vitaminas	B y K

Minerales	Triptófano, Ca, P y Mg
Azúcares	D- glucosa y D – galactosa (1:1)

*Nota:* Tomado de (Marshall & Cole, 1985; Rosa *et al.*, 2017; Wszolek *et al.*, 2006)

**Tabla 5.**

*Composición química del kéfir de leche.*

Componentes	Descripción
Humedad	90%
Azúcares	6%
Grasa	3,5%
Proteína	3%
Ceniza	0,7%
pH	4,2 – 4,6
Etanol	0,5 – 2,0 % (v/v)
Ácidos orgánicos	Ácido láctico (0,8 y 1,0 % (p/v)), ácido acético, ácido pirúvico, ácido hipúrico, ácido propiónico y ácido butírico
Componentes aromáticos	Diacetilo, etilo y acetaldehído
CO <sub>2</sub>	0,08 y 0,2 % (v/v)
Aminoácidos esenciales	Lisina (376 mg/100 g); isoleucina (262 mg/100 g); fenilalanina (231 mg/100 g); valina (220 mg/100 g); treonina (183 mg/100 g); metionina (137 mg/100 g); y triptófano (70 mg/100 g)
Lípidos*	Monoacilgliceroles, diacilgliceroles y TAG, NEFA y esteroides.
Vitaminas *	B1, B2, B5, B12, C, A, K, caroteno, ácido fólico, biotina, tiamina y riboflavina.
Minerales	Mg, Ca, P, Zn, Cu, Mn, Fe, Co y Mo
Aminas biogénicas	2,4 y 35,2 mg/L

Componentes	Descripción
Antioxidantes	Catequina

*Nota:* \* su concentración varía de acuerdo al tipo de leche. Tomado de: (Ahmed *et al.*, 2013; Altay *et al.*, 2013; Güven *et al.*, 2003; Özdestan & Üren, 2010; Rosa *et al.*, 2017; Sarkar, 2008)

### **Microbiología del kéfir de leche**

El kéfir junto con sus gránulos contiene un sin número de microorganismo que hasta la actualidad no se han descrito por completo, se estima que son más de 300 y lo que se sabe es que esta simbiosis es la responsable del ciclo de fermentación y de su capacidad de mantenerse inalterado por variaciones del tipo de leche, por contaminación bacteriana, por la presencia de antibióticos u otros compuestos inhibitorios ( Santos, 2008). Muchos autores comentan que sería casi imposible poder algún día describir totalmente su microbiología puesto que esta depende de muchos factores como la ubicación geográfica (altitud – latitud), procedencia de los gránulos de kéfir, diversas técnicas utilizadas en el procesamiento, temperatura y tiempo de fermentación, tipo y volumen de leche, condiciones de almacenamiento de los gránulos y el kéfir, cantidad de gránulos en la leche y agitación (Rosa *et al.*, 2017). En investigaciones realizadas por Witthuhn *et al.*, (2005) y Irigoyen *et al.*, (2005) se demostró que la población microbiana en las primeras horas de fermentación puede variar de  $6,4 \times 10^4$  hasta  $8,5 \times 10^8$  UFC/g para bacterias y de  $1,5 \times 10^5$  hasta  $3,7 \times 10^8$  UFC/g para levaduras; y al cabo de 24 horas esta puede presentar  $10^8$  UFC/MI de *Lactobacillus*,  $10^5$  UFC/MI de *Lactococcus*,  $10^6$  UFC/MI de levaduras y  $10^6$  UFC/MI de bacterias ácido acéticas.

Con respecto a los gránulos el 65 al 80 % de su composición son *Lactobacillus* y *Lactococcus* y el restante son levaduras, por otra parte la composición del kéfir de leche ha revelado que el mayor porcentaje de bacterias presentes pertenecen a *Lactobacillus kefir* en un 80% y el porcentaje restante pertenecen a subgéneros de *Lactobacillus* y levaduras (Leite *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2008).

Tabla 6.

*Microorganismos encontrado en el kéfir de leche*

<b>Microorganismo</b>	<b>Género</b>	<b>Especie</b>	
<b>Bacterias Ácido Lácticas</b>	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>L. plantarum</i>	
		<i>L. kefiranofaciens</i>	
		<i>L. paracasei</i>	
		<i>L. kefiri</i>	
		<i>L. parakefiri</i>	
		<i>L. acidophilus</i>	
		<i>L. casei</i>	
		<i>L. sunkii</i>	
		<i>L. johnsonii</i>	
		<i>L. rhamnosus</i>	
		<i>L. brevis</i>	
		<i>L. delbrueckii</i>	
		<i>L. helveticus</i>	
		<i>L. bulgaricus</i>	
		<i>L. fermentum</i>	
	<i>L. reuteri</i>		
	<i>Lactococcus</i> spp.	<i>L. lactis</i>	
	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>S. thermophilus</i>	
<b>Bacterias Ácido Acéticas</b>	<i>Acetobacter</i> spp.	<i>A. lovaniensis</i>	
<b>Levaduras</b>		<i>Kluyveromyces marxianus</i>	
		<i>Kluyveromyces lactis</i>	
		<i>Debaryomyces hansenii</i>	
		<i>Candida kefir</i>	
		<i>Fermentadoras de lactosa</i>	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
		<i>Kazachastania aerobia</i>	
		<i>Yarrowia lipolytica</i>	
	<i>Kazachstania unispora</i>		

Microorganismo	Género	Especie
		<i>Lachanceae meyersii</i>
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	No fermentadoras de lactosa	<i>Saccharomyces unisporus</i>
		<i>Pichia fermentans</i>
		<i>Saccharomyces turicensis</i>

Nota: Tomado de: (Slattery *et al.*, 2019)

### **Forma de fabricación del kéfir de leche**

Los principales materiales para la elaboración del kéfir de leche son los gránulos de kéfir o búlgaros y la leche, la cual puede ser entera, descremada, semidescremada o pasteurizada, se puede utilizar de cualquier origen ya sea de cabra, oveja, camello o búfala, pero la leche de vaca es la más común. Para iniciar la fermentación se pone en contacto los gránulos y la leche en un recipiente de vidrio parcialmente cerrado porque se debe permitir la interacción con el oxígeno, usualmente la relación gránulos:leche se da de manera empírica, pero se ha descrito que la relación ideal es de 1:30 a 1:50 (p/v), la temperatura de fermentación es de 8 – 25 °C , en un tiempo variable de 10 a 40 h, pero usualmente esta ocurre a las 24 h(Güven *et al.*, 2003; J. P. V. Santos, 2008; Slattery *et al.*, 2019).

Una vez que se haya dado la fermentación se filtra el fermento y se separan los gránulos de la leche de kéfir y está listo para el consumo o se lo puede refrigerar para evitar que continúe la fermentación, en la etapa de enfriamiento usualmente ocurre una pequeña etapa de fermentación alcohólica o lo que se le conoce como etapa de maduración, aquí se produce la acumulación de dióxido de carbono, etanol y complejo de vitamina B, en esta etapa también hay una disminución del contenido de lactosa y en esta instancia el kéfir de leche es mucho más comprometedor para aquellas personas con intolerancia a la lactosa o diabetes(Garrote *et al.*, 2010; Rosa *et al.*, 2017c).

### ***Kéfir en la enfermedad y salud gastrointestinal***

Una de las ventajas potenciales que ha revelado el kéfir de leche ante otros productos lácteos es que se puede consumir por todas las personas en general, especialmente aquellas intolerantes a la lactosa debido a que las bacterias procedentes del fermento tienen la capacidad de secretar  $\beta$ -galactosidasa que es una enzima capaz de hidrolizar la lactosa y reducir con ello su concentración, se ha descrito que el kéfir de leche posee más del 60% de  $\beta$ -galactosidasa que cualquier otro lácteo (Hertzler & Clancy, 2003). Varios estudios han demostrado que el kéfir de leche revela un impacto en el estreñimiento y puede mejorar la puntuación de satisfacción intestinal y reducir el tránsito intestinal (Maki *et al.*, 2018; Rezac *et al.*, 2018; Turan *et al.*, 2014). Se ha demostrado también que el kéfir de leche tiene la capacidad de desplazar *Helicobacter pylori* y erradicarlo por completo (Bekar *et al.*, 2011). Se ha descrito que *L. plantarum* CIDCA 83114 una cepa aislada del kéfir desarrolla un papel antagonista contra *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) *in vitro* (A. A. Hugo *et al.*, 2008), tiene la capacidad de inhibir los efectos citotóxicos de la toxina Shiga tipo II producida por *E. coli* O157: H7 (Kakisu *et al.*, 2013) y además desarrolla un efecto protector a las células epiteliales por la colonización de *Shigella flexneri* (Bolla *et al.*, 2016). Por otra parte, *L. kefir* tiene la capacidad de evitar la adhesión y la invasión de *Salmonella* spp., *Typhimurium* spp. a células Caco-2/TC-7 (Golowczyc *et al.*, 2007).

Con respecto al potencial de las cepas de levaduras del kéfir como *S. cerevisiae*, *S. unisporus*, *I. occidentalis* y *K. marxianus* se ha reportado que estas tienen la capacidad de sobrevivir en el ambiente gastrointestinal y además se adhieren a células Caco-2 (Diosma *et al.*, 2014) y por su parte una cepa CIDCA 8154 de *K. marxianus* ha demostrado reducir las tasas de oxidación intracelular protegiendo a las células epiteliales del estrés oxidativo, por otra parte también se ha evidenciado que protege del daño histopatológico y de los niveles bajos de IL-6 circulante de ratones infectados *in vivo* con colitis (D. E. Romanin *et al.*, 2016). Por otra parte D. Romanin *et al.*, (2010), describieron que cepas de levaduras

provenientes del kéfir demostraron modular una variedad de agonistas proinflamatorios como flagelina, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y LPS.

El kefirán también ha revelado varios beneficios en la salud gastrointestinal, este al ser un polisacárido no digerible tiene la capacidad de sobrevivir al ambiente ácido del intestino grueso y efectuar sus funciones antimicrobianas, antiinflamatorias y antialérgicas (Kwon *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2005; Vinderola *et al.*, 2006). Por otra parte, este puede elevar los niveles de bifidobacterias en el colon y el número de células intestinales productoras de mucus (Medrano *et al.*, 2011). Además, el kefirán desarrolla un papel antagonista contra los factores de virulencia de patógenos *in vitro* y disminuir la presión arterial y los niveles de colesterol en suero (Maeda *et al.*, 2004; Medrano *et al.*, 2008)

### **Marco legal del kéfir de leche**

#### **Tabla 7.**

*Composición del kéfir de leche según el Codex Alimentarius (Codex Stan 243-2003)*

<b>Componentes</b>	<b>Contenido</b>
Proteína láctea	min 2,7%
Ácido láctico	min 0,6%
Grasa láctea	min 10%
Total de microorganismos	min 10 <sup>7</sup> (UFC)/mL
Levaduras	min 10 <sup>4</sup> (UFC)/mL
Bacterias probióticas	min 10 <sup>6</sup> (UFC)/mL

*Nota:* Tomado de Codex Alimentarius., (2003)

**Tabla 8.**

*Requisitos microbiológicos en leche fermentada según norma NTE INEN 2395:2011*

<b>Requisito</b>	<b>n</b>	<b>m</b>	<b>M</b>
Coliformes totales (UFC/g)	5	10	100
Recuento de <i>E. coli</i> (UFC/g)	5	<1	-
Recuento de mohos y Levaduras (UFC/g)	5	200	500

*Nota:* n= Número de muestras a evaluar ; m= Índice máximo permisible para determinar nivel de buena calidad; M= Índice máximo permisible para determinar nivel aceptable de calidad. Tomado de INEN,(2011)

### **Mercado de suplementos alimenticios para animales de compañía**

En la actualidad se ha experimentado un alza en el mercado sobre los suplementos alimenticios para mascotas y se muestran con un futuro comprometedor como una nueva línea de negocio puesto que las mascotas en especial los perros se han convertido en la prioridad de muchos hogares por el lazo emocional-afectivo entre mascota-humano y su bienestar tanto fisiológico como emocional se ha vuelto fundamental, por lo que las vitaminas, minerales y demás nutrientes es lo que se necesita para que las mascotas puedan vivir una vida saludable. Esta creciente aceptación también ha sido aceptada ya por muchos veterinarios que corroboran que con este tipo de suplementos se puede prevenir o aliviar patologías o trastorno del animal y sobre todo se ha visto un incremento en el promedio de vida de las mascotas y de este hecho también ha surgido que aumenten los problemas de salud por causa del envejecimiento y los veterinarios aconsejan el uso de suplementos alimenticios que les alivien o prevengan de diversos problemas de salud(Gaviria, 2016).

En la región latinoamericana este realce de línea de negocio también ha sido muy bien influenciado puesto que somos el continente con mayor masa de mascotas; en el 2017 se reportó la



existencia de 670 millones de mascotas en todo el mundo y ya para el 2022 se estima que habrá 730 millones del cual el 45% del crecimiento se dará en América Latina y el Caribe y de esta región el 72%, es decir, 115 millones será del incremento de canes. Es por esta razón que se han calculado proyecciones en el mercado de mascotas, en el 2018 la industria global del Pet Food se valoró, en 83.02 mil millones de dólares; actualmente, después de todos los percances ocurridos en el año 2020 por la pandemia de covid-19, se pronostica que, para el año 2025, la industria reciba una tasa de crecimiento anual compuesta de 4,5%. Por lo que se espera que para el año 2025 la industria llegue a los 90.4 mil millones de dólares. Por otra parte, la industria de mascotas Packaged Facts pronostica que haya un aumento en sus ventas a diferencia del 2021 del 5,5% para el 2022, seguido de un aumento del %5 para los años 2023 y 2024(Carbajo, 2021).

Estas cifras prometedoras a la evolución de las ventas de los productos que comienzan a tener mayor demanda según Afepadi, (2018) son:

- **Para huesos y articulaciones:** este debido al incremento de esperanza de vida de las mascotas, entonces las mascotas empiezan a revelar trastornos articulares y los suplementos más demandados para aliviar los síntomas o prevenir son glucosamina, condroitina, el metilsulfonilmetano (MSM), la boswellia o yuca.
- **Para control de peso o colesterol:** este debido al factor común que tienen los perros en desarrollar cuadros de sobrepeso y obesidad y se ha visto que una buena suplementación probiótica ayuda a regular o prevenir estos trastornos.
- **Para el control digestivo:** sobre todo en este aspecto los suplementos alimenticios han sido más demandados, con el fin de mantener y promover la salud gastrointestinal por medio de recetas únicas de prebióticos, probióticos y enzimas digestivas.

- **Para el tratamiento del pelaje:** se ha evidenciado que los animales de compañía especialmente perros están muy expuestos alergias estacionales, picores o irritaciones de piel, por lo que las suplementaciones de ácidos grasos como Omega-3 y probióticos con estas características antioxidantes son cada vez más demandados.

### **Mercado de probióticos para animales de compañía**

Muchos estudios han revelado la importancia del uso de suplementaciones probióticas por los múltiples beneficios que otorgan a la salud por lo que se pronostica que los ingresos anuales mundiales alcancen los 64 mil millones de dólares para 2023(Sb *et al.*, 2020). La comercialización de probióticos se ha dado de diferentes formas como cápsulas, alimentos fermentados y suplementos lácteos, otro de los beneficios de las características que los probióticos han revelado al consumidor son debido a su bajo costo, baja probabilidad de eventos adversos y por su facilidad de ingesta(Reid *et al.*, 2019). Por sus múltiples beneficios sobre todo por trastornos gastrointestinales y como suplementación después de una fuerte ronda de antibióticos los veterinarios recetan su consumo pese a que son productos que no han sido regularizados hasta la actualidad y solo se tiene evidencia empírica de sus beneficios(Metras *et al.*, 2020).

El crecimiento del mercado probiótico en América Latina y el Caribe aun es incierto, a diferencia de Asia, China, India y Japón que son regiones que dominan el mercado probiótico pese a los percances vividos por la pandemia de covid-19 y esto debido a su elevado avance tecnológico y por sus estrategias de inversión de I+D para la creación de nuevas cepas probióticas potenciales(Mordor Intelligence, 2020).

En la actualidad solo existe un estudio llevado a cabo por Metras *et al.*, (2020) que revela el contenido real de los productos comerciales de kéfir diseñados para animales de compañía en el que se encontraban varias marcas especialmente extranjeras con diferentes presentaciones como The Honest Kitchen Daily Boosters Instant Goat's Milk, Open Farm Raw Organic Grass-Fed Kefir Topper, Pet Food

Raw Cow's Milk Kefir, Coco Love Coconut Kefir for Dogs Nuggets, Champions Choice Natural Kefir y Only Natural Raw Goat Milk Kefir; en el Ecuador no se patentado ninguna marca comercial probiótica para animales de compañía; y esta experimentación reveló que las seis marcas analizadas no contenían los recuentos bacterianos puestos en la etiqueta y además muchas de las afirmaciones con respecto a los beneficios en la salud no tiene respaldo científico y pese a ello se comercializan. En la actualidad solo existen dos ensayos clínicos publicados en perros el de Kim *et al.*, (2019) en donde evaluaron el efecto modulador del kéfir de leche en la microbiota intestinal canina y se demostró que esta es capaz de modular la microbiota a partir de la 2 semana de suplementación continua y el segundo por Gaspardo *et al.*, (2020) que evaluó la seguridad y facilidad de administración de *Lactobacillus kefir* (bacteria láctica que conforma el 80% del consorcio) en perros sanos y su capacidad para regular la microbiota intestinal con su consecuente secreción de IgA, sin embargo, no lograron demostrar el efecto deseado.

### **Sistema digestivo de los perros**

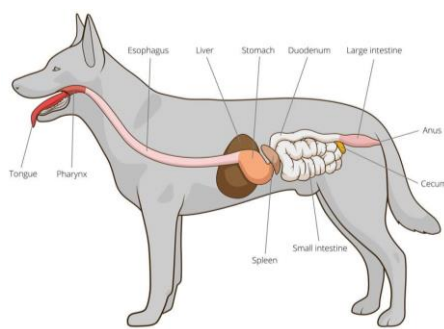
Los perros son seres oportunistas y generalistas en su mayoría, puesto que genéticamente son omnívoros, es decir, comen tanto vegetales como carne y su digestión es a fin con cualquiera de las dos dietas; pese de que estos fueron domesticados ya hace más de 12.000 o 14.000 años su sistema digestivo sigue siendo igual y no ha cambiado pese a los cambios dietéticos que ha experimentado hasta la actualidad (Gaviria, 2016).

El sistema digestivo de los perros es mucho más complejo pero muy parecido a la del humano con algunas diferencias marcadas sobre todo respecto a la sección de ingesta como la boca, faringe y esófago que tienen una longitud mayor a la del humano y varía de acuerdo con la raza, las paredes internas del esófago son muy gruesas debido a que tiene como función triturar lo que mas se pueda el bolo alimenticio puesto que los perros a penas y mastican el alimento y es por esto también que sus glándulas salivales no secretan la ptialina (encargada de la hidrólisis de los carbohidratos), y también

tiene muy pocas papilas gustativas. Una vez que ya pasa a la sección de digestión el bolo alimenticio ya tiene contacto con los ácidos gástricos, que en este caso es mucho más ácido que la del humano debido a que le permite digerir huesos o combatir contra patógenos; el tamaño del estómago y del hígado también son mucho mayores y el estómago no sirve solo para digerir si no también para almacenar alimento; en esta sección es donde se secretan la mayor cantidad de enzimas digestivas especialmente provenientes del páncreas, antes de que el bolo alimenticio sea almacenado en la vesícula biliar este pasa por un tratamiento de bilis, en donde digieren todas las grasas y aquí también el hígado tiene la función de eliminar sustancias tóxicas; la longitud del intestino delgado varía de acuerdo al tamaño del perro pero se suele encontrar dentro de un intervalo de 2 a 6 metros y es donde se produce la mayor cantidad de reacciones químicas para la digestión. Una vez que el bolo alimenticio ya pasa a la sección impulsiva este va primero al intestino grueso, que contrario al delgado tiene una longitud muy pequeña que va desde los 20 a los 80 cm, sin embargo, aquí el bolo alimenticio pasa un buen tiempo con el fin de que se fermenten todos los alimentos no digeridos, y aquellos que no han sido bien digeridos se quedan almacenados en vez de ser expulsado, como son usualmente los huesos (Ishida *et al.*, 2018; Tello Valencia, 2013).

### Figura 3.

#### *Sistema digestivo de perros*



*Nota:* Tomado de («Carnívoros, Omnívoros & Herbívoros», 2017)

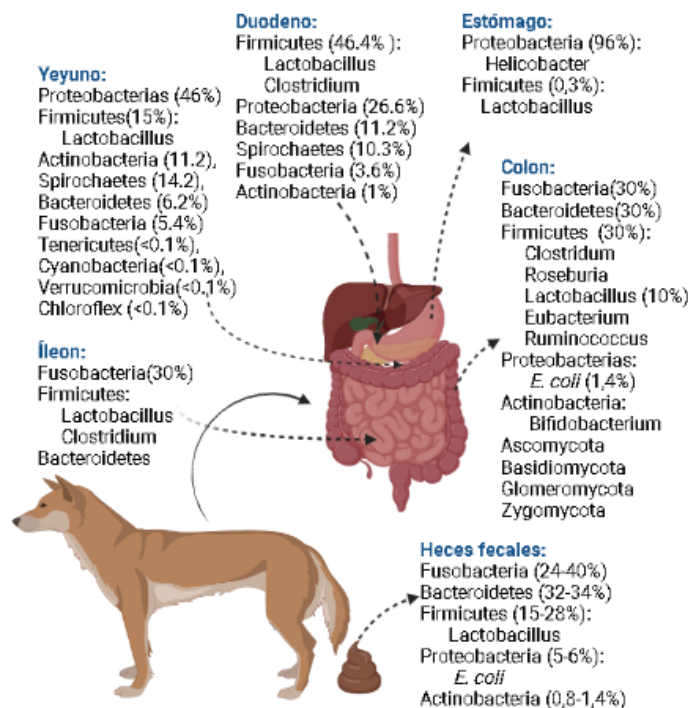
## Microbiota intestinal de perros

Para empezar a describir el microbiota intestinal canina se debe comprender a que se refiere el término “microbiota” el cual fue acuñado por Joshua Lederberg y se refiere a toda esa comunidad ecológica de microorganismos comensales, simbióticos y patógenos que comparten un espacio corporal (Schmitz & Suchodolski, 2016). En el caso de los canes su microbiota intestinal es tan compleja y variada que supera a la del humano puesto que presenta más de un millar de fenotipos bacterianos y su diversidad va aumentando de acuerdo aumenta el paso por el sistema gastrointestinal y esta diversidad se ve muy marcada entre las diferentes razas de canes, nichos intestinales y área geográfica (Grześkowiak *et al.*, 2015). Se describe que el microbiota intestinal de canes es 10 veces más que el número de células del huésped. Además, esta complejidad microbiana es esencial para la regulación de la salud y la inmunidad del huésped puesto que los metabolitos producidos por estos microorganismos son los que mantienen el equilibrio microbiota-huésped (eubiosis); algunos de los beneficios que estos microorganismos otorgan al huésped es que son una barrera de defensa contra patógenos transitorios, descomponen y obtienen energía de los nutrientes, producen metabolitos nutricionales a los enterocitos y ayudan a la regulación del sistema inmune. Cuando hay una alteración o desequilibrio de la microbiota-huésped se le conoce como disbiosis, es decir, hay un aumento desmedido de microorganismos patógenos y es lo que produce los trastornos del sistema gastrointestinal como las enteropatías crónicas y la colitis granulomatosa en perros (Pilla & Suchodolski, 2020).

En la actualidad, se ha podido identificar la mayor cantidad de microorganismos del tracto gastrointestinal a través de la amplificación del gen del ARNr 16S en una secuenciación de alto rendimiento, a continuación, se reportan algunas de ellas:

Figura 4.

*Tracto gastrointestinal canino y sus microorganismos dominantes.*



*Nota:* Obtenido de: (Grześkowiak *et al.*, 2015a; Pilla & Suchodolski, 2020; Schmitz & Suchodolski, 2016)

### Efecto de la dieta probiótica sobre la microbiota intestinal canina

El efecto de una suministración probiótica en animales de compañía como los perros no ha sido muy bien estudiado por lo que no existe un respaldo científico fuerte que describa la calidad de los productos probióticos para animales de compañía o de la supervivencia probiótica en el sistema gastrointestinal, este tipo de suministración se ha estudiado principalmente en animales de granja para el control de diversos trastornos y enfermedades (Grześkowiak *et al.*, 2015).

Con el tiempo se han descrito los múltiples beneficios que pueden otorgar los probióticos a las mascotas como: la regulación del sistema inmunológico, ayuda a mantener perfiles bajos de estrés y obesidad, desplaza enteropatógenos causantes de infecciones, promueve el crecimiento y desarrollo y regula los trastornos alérgicos(Grzeškowiak *et al.*, 2015).

La falta de respaldo científico según Schmitz & Suchodolski, (2016) dicen que se debe principalmente a 4 razones y es debido a que se han utilizado técnicas de secuenciación muy tradicionales que han limitado la cuantificación de un gran número de bacterias, la mayoría de los estudios se han efectuado en canes sanos lo que ha imposibilitado la comparación con canes enfermos o susceptibles a trastornos gastrointestinales, en la mayoría de los estudios se han tomado muestras de heces fecales en lugar de biopsias de mucosas o ingestas y por último se han suplementado una gran gama de productos probióticos y dosis lo que de igual forma a dificultado la comparación con otras investigaciones.

La mayoría de probióticos tienen como base bacterias ácido-lácticas (BAL) las mismas que se encuentran en pequeñas cantidades en el intestino canino, incluida las especies de *Lactobacillus* como *L. fermentum* (VET9A), *L. plantarum* (VET14A), *L. rhamnosus* (VET16A) los cuales han demostrado su potencial probiótico por su capacidad de adherencia al moco intestinal pudiendo de esta manera desplazar enteropatógeno como *Enterococcus canis*, *C. perfringens*, *Salmonella entérica*, etc (Grzeškowiak *et al.*, 2015).

Hay varias evidencias que revelan el supuesto potencial de bacterias probióticas aisladas de animales y aplicadas en perros como es el caso del estudio de O'Mahony *et al.*, (2009) en la que se puso a prueba la calidad de *L. acidophilus* (DSM13241) el cual sobrevivió al tránsito intestinal y aumento a los lactobacilos y disminuyó los clostridios en las heces fecales causantes de diarrea crónica en perros. Por otra parte una investigación realizada por Weese & Anderson, (2002) reveló que la aplicación de *E.*

*Faecium* (NCIB 10415) como cepa probiótica en canes produjo un aumento de los recuentos bacterianos de *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp. pero redujo los niveles clostridiales; es por esto que varios investigadores se han replanteado el uso de estas cepas como potenciales probióticos y buscar otras fuentes de suplementación como es el caso de las bebidas fermentadas como kéfir de leche, pese al impulso en la actualidad solo existen dos investigaciones que pusieron a prueba el potencial probiótico del kéfir de leche, el uno desarrollado por Kim *et al.*, (2019) en donde evaluaron el efecto modulador del kéfir de leche en la microbiota intestinal canina y se demostró que esta es capaz de modular la microbiota a partir de la 2 semana de suplementación continua y el segundo por Gaspardo *et al.*, (2020) que evaluó la seguridad y facilidad de administración de *Lactobacillus kefir* (bacteria láctica que conforma el 80% del consorcio) en perros sanos y su capacidad para regular la microbiota intestinal con su consecuente secreción de IgA, sin embargo, no lograron demostrar el efecto deseado.

### **Medios de cultivo**

Los medios de cultivo permiten el crecimiento de microorganismos en el laboratorio, los cuales les brindan los nutrientes y condiciones fisicoquímicas necesarias para su desarrollo. Usualmente los medios son dispensados en cajas Petri o en tubos de ensayo de acuerdo a la utilidad de la prueba. Los medios de cultivo se clasifican de acuerdo con su proporción en agar en sólidos, semisólidos y líquidos y de acuerdo a su utilidad en nutritivos, de enriquecimiento, selectivos y diferenciales (Barrero Cuevas, 2016).

### **Medios selectivos**

Poseen componentes inhibidores que evitan el crecimiento de cierto tipo de microorganismo y solo permite el crecimiento de las bacterias deseadas. Por ejemplo, el agar MacConkey posee sales biliares y cristal violeta, el cual inhibe el desarrollo y crecimiento de bacterias grampositivas y hongos, permitiendo el desarrollo de bacterias gramnegativas (Barrero Cuevas, 2016).



### ***Medios diferenciales***

Poseen componentes que ayudan al manifiesto de algunas características comunes de especies o grupos de microorganismos. Por ejemplo, agar MacConkey posee lactosa y rojo neutro (como indicador) lo que causa la revelación de las bacterias fermentadoras de lactosa puesto que se muestran con una coloración rosa intenso mientras las que no fermentan (lactosas negativas) simplemente no producen color y se muestran incoloras o blanquecinas (Barrero Cuevas, 2016).

### **Medios de cultivo utilizados en la presente experimentación**

#### ***Agar MacConkey***

Se caracteriza por ser un medio selectivo-diferencial que usualmente se utiliza para el aislamiento e identificación de enterobacterias como bacilos gramnegativos. Está compuesto por sales biliares, cristal violeta, lactosa y rojo neutro. Los compuestos selectivos son las sales biliares y el cristal violeta puesto que no permiten el crecimiento de grampositivos y hongos; por otra parte, lactosa y el rojo neutro (indicador de pH) son los compuestos diferenciales que permiten la identificación de bacterias fermentadoras o no fermentadoras de lactosa, las lactosas positivas acidifican el medio y revelan una coloración rosa intenso (por ejemplo, *E. coli*) mientras que las lactosas negativas no acidifican el medio y se muestran incoloras o blanquecinas (por ejemplo, *Salmonella* spp.) (Barrero Cuevas, 2016).

#### ***Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)***

Se caracteriza por ser también un medio selectivo-diferencial. Está compuesto por sales biliares y colorantes como fucsina ácida y azul de bromotimol, los cuales retrasan el crecimiento de otras bacterias diferentes al género de *Salmonella* spp. y *Shigella* spp., Los componentes diferenciales ayudan a identificar las bacterias fermentadoras o no fermentadoras de lactosa en este caso las lactosas negativas presentan una coloración verdeazulada mientras que las lactosas positivas revelan una coloración

amarillo a salmón debido al cambio de color del azul de bromotimol (por ejemplo, *E. coli*) (Barrero Cuevas, 2016).

### ***Agar Müller-Hinton***

Es un medio no selectivo y no diferencial, es decir, en el crecerá cualquier tipo de microorganismo. Está compuesto por extracto de carne, hidrolizado de caseína, almidón y agar. Este se diferencia mucho de los otros medios porque es ideal para pruebas de sensibilidad a antibióticos y esto debido a que es un agar suelto, es decir, contiene menor proporción de agar que otros medios, lo que le posibilita que los antibióticos se difundan con mayor facilidad en el medio y se observen las zonas de inhibición, además, el almidón tiene la capacidad de absorber las toxinas liberadas por las bacterias evitando así que estas interfieran con los antibióticos (BD, 2017).

### ***Caldo Nutriente***

Se caracteriza por ser un medio no selectivo, se utiliza usualmente para el crecimiento de microorganismos no exigentes. Está compuesto por pluripeptona, es decir, una mezcla de partes iguales de peptona de carne, caseína y extracto de levadura como fuentes de carbono y nitrógeno, y cloruro de sodio que se encarga de mantener el equilibrio osmótico del medio (Britania, 2016).

## **Pruebas Bioquímicas**

### ***Indol***

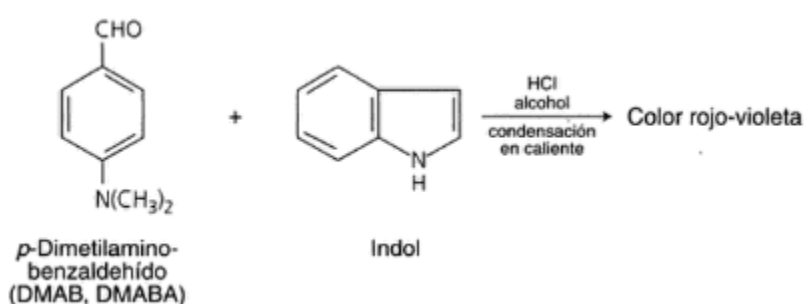
Es una prueba que permite la identificación de aquellas bacterias que tienen la capacidad de romper el triptófano con la ayuda de la enzima triptofanasa causando una hidrólisis del aminoácido y su desaminación, obteniendo como productos finales indol, ácido pirúvico, amoníaco y energía.

Usualmente para esta prueba se utiliza previamente un medio de crecimiento bacteriano como caldo nutriente y una vez que las bacterias ya hayan crecido en el medio se dispensa un par de gotas del reactivo de Kovac que está compuesto por para-dimetil-aminobenzaldehído más alcohol amílico o

isoamílico y ácido clorhídrico concentrado; y a partir de ahí se efectúa la reacción descrita, cuando la reacción es positiva se da la formación de un anillo rojo, esto debido a que cuando se da la producción de indol este reacciona en medio ácido con el p-dimetil-aminobenzaldehído formando un compuesto quinoidal de color rojo violeta (Vásquez *et al.*, 2017).

**Figura 5.**

*Reacción de la prueba del indol*



*Nota:* Tomado de (Vásquez *et al.*, 2017).

### **Triple Sugar Iron Agar/ Agar triple azúcar hierro (TSI)**

Se caracteriza por ser un medio diferencial, especialmente para bacterias gramnegativo, capaces de fermentar azúcares y producir sulfuro. Está compuesto por peptona, extracto de carne y levadura, sacarosa, glucosa, lactosa, sulfato de hierro, cloruro sódico (mantiene el balance osmótico), tiosulfato de sodio y rojo fenol (indicador del pH). Según, (BD, 2015) nos habla de que se pueden evidenciar varias reacciones en el medio de TSI

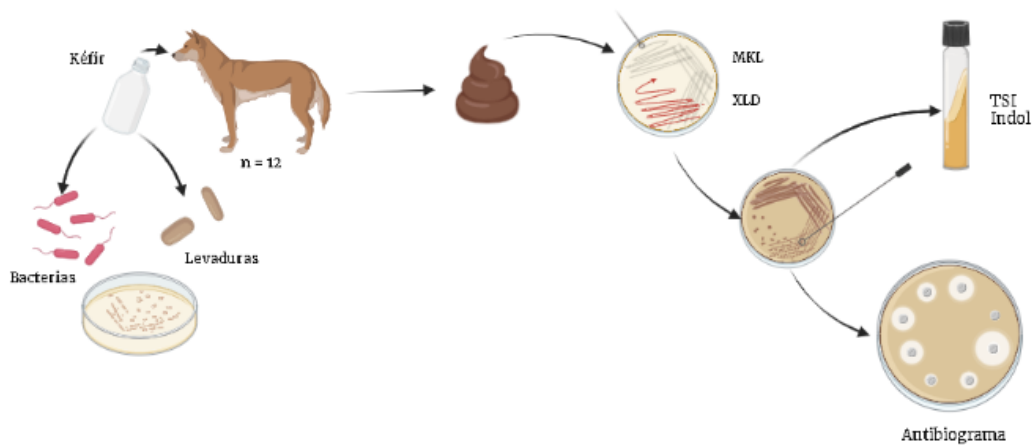
- Cuando las bacterias son fermentadoras de glucosa estas acidifican el medio y revelan una coloración amarilla en el fondo del tubo, por el contrario, si son fermentadoras de glucosa negativo el medio permanecerá de color rojo.

- Cuando las bacterias son fermentadoras de lactosa o sacarosa estas acidifican el medio y revelan una coloración amarilla en la parte superior del medio, si son fermentadoras de glucosa negativo el medio permanecerá de color rojo.
- Si se da una reducción de las sales de hierro, es decir, del tiosulfato de sodio con la consecuente formación de ácido sulfúrico con las fuentes de iones  $Fe^{3+}$  (sulfato de hierro y amonio) producirán sulfuro de hierro que se revelará con un ennegrecimiento del medio el cual suele impedir observar la fermentación de la glucosa, sin embargo, esto revela directamente que es una bacteria fermentadora de glucosa.
- Si existe un desplazamiento o rotura del medio esto significa que la bacteria es productora de gas.

### Capítulo III: Materiales y Métodos

Figura 6.

*Evaluación del kéfir de leche en el fenotipo de resistencia de Escherichia coli.*



## **Zona de estudio**

El proyecto involucró dos fases:

### ***Obtención de muestra canina***

Las muestras de heces caninas fueron recolectadas de la Veterinaria Acción Animal, cuyo propietario corresponde al señor Camilo Ramírez, en la Parroquia Conocoto, Sector la Moya, Cantón Rumiñahui, de la Provincia de Pichincha, ubicado en la calle Eugenio Espejo y Mejía al suroriente del país, Latitud: 0°18'05.9"S, Longitud: 78°28'25.0"O.

### ***Trabajo de laboratorio***

Después de la recolecta el trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de enzimología CICTE de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, que se encuentra ubicada en la Av. General Rumiñahui S/N y Ambato.

### **Preparación del Kéfir**

Para la elaboración de la suplementación probiótica de kéfir de leche se utilizaron 75 gr de gránulos iniciadores de leche obtenidos comercialmente, los cuales se inocularon en 720 mL de leche entera, en un recipiente de vidrio de boca ancha, se cubrió el recipiente con papel toalla para evitar cualquier tipo de contaminación y se cultivaron a temperatura ambiente por 18 – 20 h. Después de la fermentación a un pH de 4, se separaron los gránulos de la leche de kéfir utilizando un cernidor esterilizado. El fermento fue preparado diariamente durante todo el periodo experimental.

### **Animales y diseño experimental**

En la presente experimentación se incluyeron perros adultos sanos, de los cuales 11 fueron mestizos y uno de raza pitbull (n=12, 7 machos, 5 hembras; edad media de perros  $\leq 6$  (adultos; rango:1-5) y geriátricos(rango: 7-12) de  $1,83 \pm 1,28$  y  $9,33 \pm 1,58$  años respectivamente)(Tabla 1). Los perros fueron cedidos por la Veterinaria Acción Animal – Ecuador, estos estaban bajo el cuidado y protección

de la institución. Seis de los perros estaban alojados individualmente y los otros 6 en dos grupos de 3, la limpieza de las jaulas se efectuó constantemente por el personal de la veterinaria y se les proporcionó ejercicio al aire libre una vez al día. La alimentación de los perros se mantuvo con total normalidad, balanceado, dos veces al día y el agua fue dada ad libitum. La investigación se realizó en tres fases, la primera fase o fase de adaptación, tomó un total de 3 días, en la que cada perro fue sometido a una administración diaria de 60 mL con el fin de observar su tolerancia al kéfir de leche, posterior a esta fase, prosiguió la fase de descanso o vacío de 5 días previo al día 0 (d0) de la fase experimental. Finalmente, la fase experimental tuvo una duración de 28 días con una suplementación diaria de 60 mL de kéfir de leche, controlando su administración hasta su consumo total. El consumo, tanto de los alimentos, agua como de kéfir de leche se registraron diaria e individualmente para cada perro.

**Tabla 9.**

*Características de los perros en investigación*

	<b>Raza</b>	<b>Género</b>	<b>Edad</b>	<b>Peso</b>	<b>Puntaje de condición corporal (PCC)</b>	<b>Puntuación fecal (PF)</b>
k1	Mestizo	MC	5	17,6	3	5
k2	Mestizo	MC	7	13,86	3	5
k3	Mestizo	HC	10	18,96	4	1
k4	Mestizo	HC	10	18	4	1
k5	Mestizo	HC	1	16,7	3	1
k6	Mestizo	HC	1	16,6	3	1
k7	Pitbull	MC	2	25	3	1
k8	Mestizo	MC	1	19,3	4	1
k9	Mestizo	HC	7	15,6	3	1
k10	Mestizo	MC	1	11,58	2	2
k11	Mestizo	MC	12	16	4	1

k12	Mestizo	MC	10	16,2	5	5
-----	---------	----	----	------	---	---

*Nota:* HC = hembra castrada, MC = macho castrado. Todos los perros mantenían una dieta balanceada.

### Condición corporal

El puntaje de condición corporal (PCC) de cada perro se monitorizó contantemente durante toda la fase experimental, la cual fue evaluada según Kim *et al.*, (2019) de la siguiente manera: 1 = muy delgada (los huesos como las costillas se podían observar y palpar fácilmente sin cobertura de grasa), 2 = bajo peso (los huesos se podían palpar con una pequeña cantidad de cobertura de grasa), 3 = ideal (las costillas se pueden palpar a través de una ligera cubierta de grasa), 4 = sobrepeso (costillas difíciles de palpar debido a la cobertura de grasa moderada), y 5 = obesos (costillas difíciles de palpar debido a la gruesa cubierta de grasa).

### Muestreo

La toma de las muestras fecales frescas se realizó al d0, d14y d28 de la fase experimental. Inicialmente las muestras pasaron por una evaluación de acuerdo con la puntuación fecal (PF) de Bristol (Lewis & Heaton, 1997): 1 = bultos duros separados; 2 = grumoso y parecido a una salchicha; 3 = una forma de salchicha con grietas en la superficie; 4 = como una salchicha o serpiente suave y suave; 5 = manchas suaves con bordes claros; 6 = consistencia blanda con bordes irregulares; y 7 = consistencia líquida sin piezas sólidas. Se realizaron las tomas de heces inmediatamente después de la defecación voluntaria de los perros durante su respectivo paseo individual, mediante un hisopado en diferentes áreas de las heces para mantener la aleatorización de la muestra y posterior a ello, se realizó la inoculación primaria en medios selectivos - diferenciales para enterobacterias como Agar MacConkey (Titan Biotech) y Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (MERCK). Posteriormente, las muestras fueron trasladadas en un contenedor en un periodo aproximado de 3 h a temperatura ambiente al laboratorio para continuar con su siembra.

### **Siembra y aislamiento de bacterias**

Inmediatamente, al llegar las muestras al laboratorio se realizó la estriación por agotamiento del inoculo primario de los medios selectivos - diferenciales para enterobacterias y se colocaron en fundas de plástico estériles por 48 - 72 h.

### **Identificación de enterobacterias**

Después de las 48 - 72 horas del aislamiento bacteriano se tomaron 5 colonias del cultivo las cuales fueron seleccionadas por su aspecto, textura, olor, color y capacidad de fermentar la lactosa y se sembraron en medios de indol y TSI, al cabo de 24 horas se observaron los resultados.

### **Sensibilidad antibiótica**

Utilizando el método Kirby Bauer, para la preparación del inóculo se tomó con un hisopo 2 de las 5 colonias aisladas en TSI, se sembró en 9 mL de agua estéril hasta conseguir una turbidez del 0.5 de la escala de MacFarland. Al haber obtenido la turbidez ideal se introdujo un hisopo dentro de la suspensión y se eliminó el exceso de líquido rotando el hisopo por las paredes del tubo. A continuación, dentro de un área totalmente estéril se inoculó las placas de Mueller-Hinton deslizándolo el hisopo por la superficie del agar 2 veces, rotando la placa unos 180° cada vez y pasándola por último por la periferia del agar con el fin de cubrir el medio totalmente y no dejar ninguna zona libre, se colocó la tapa de la placa y se dejó secar de 3 a 5 minutos antes de depositar los discos; inmediatamente se colocaron los discos con antibióticos mediante el uso de pinzas estériles con una distancia a la pared de la placa de 15 mm y entre ellos de 30 mm, se oprimió ligeramente los discos para asegurar un buen contacto con el medio de cultivo, las placas fueron colocadas en fundas estériles y se dejó inocular las placas invertidas por un periodo de 48 h a temperatura ambiente. Con respecto al Método de Jarlier, el procedimiento se dio a la par y de la misma manera con la diferencia que se colocó un disco inhibidor de  $\beta$  - lactamasas (Amoxicilina/ác. clavulánico) en el medio de la placa y alrededor de él se colocaron las cefalosporinas



(Ceftazidima, Ceftriaxona, Cefazolina y Cefuroxima). La medida del diámetro de la zona de inhibición se midió con una regla milimetrada desde el exterior de la placa sin quitar la tapa, para el caso de la revelación de BLEE con el Método de Jarlier se observó si hubo alguna sinergia entre la Amoxicilina/ác. clavulánico y las cefalosporinas y finalmente se interpretaron los resultados según Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (M100-S24).

**Tabla 10.**

*Antibióticos probados y clases de antibióticos correspondientes al fenotipo de E. coli*

<b>Código</b>	<b>Antibiótico</b>	<b>Clase de antibiótico</b>
SAM-20	Ampicilina/sulbactam	$\beta$ - lactamasas
CAZ-30	Ceftazidima	Cefalosporinas
CRO-30	Ceftriaxona	Cefalosporinas
CN-10	Gentamicina	Aminoglucósidos
TE-30	Tetraciclina	Tetraciclinas
CIP-5	Ciprofloxacina	Fluoroquinolonas
SXT-25	Trimetoprima/sulfametoxazol	Inhibidores de la vía del folato
AM-10	Ampicilina	Penicilinas
CZ-30	Cefazolina	Cefalosporinas
AK-30	Amikacina	Aminoglucósidos
AMC-30	Amoxicilina/ác. clavulánico	$\beta$ - lactamasas
CXM-30	Cefuroxima	Cefalosporinas

### **Análisis estadístico**

Todos los datos se representan como la media  $\pm$  margen de error. Para los análisis estadísticos se utilizó el software InfoStat se aplicó tanto una estadística descriptiva como diferencial. Para graficar los resultados de la resistencia fenotípica de *E. coli* se utilizó un Box-Plot, posterior a ello se realizó un test de comparaciones múltiples de Duncan utilizaron un valor  $- p < 0,05$ .

## Capítulo IV: Resultados

### Animales

Los exámenes físicos y parámetros fecales de los 12 perros adultos sanos incluidos en el estudio mostraron una edad media de perros  $\leq 6$  (adultos) y geriátricos de  $1,83 \pm 1,28$  y  $9,33 \pm 1,58$  años respectivamente. El peso de ambos grupos no vario se mantuvo en una media de  $17,8 \pm 3,5$  y  $16,44 \pm 1,45$  kg respectivamente, al igual la puntuación de condición corporal (PCC) de  $3 \pm 0,5$  y  $3,83 \pm 0,6$  se mantuvo en un promedio normal y su puntuación fecal (PF) inicial y final fue normal (rango: 1-5). En conclusión, no hubo cambios significativos de PCC, PF ni peso durante el periodo experimental.

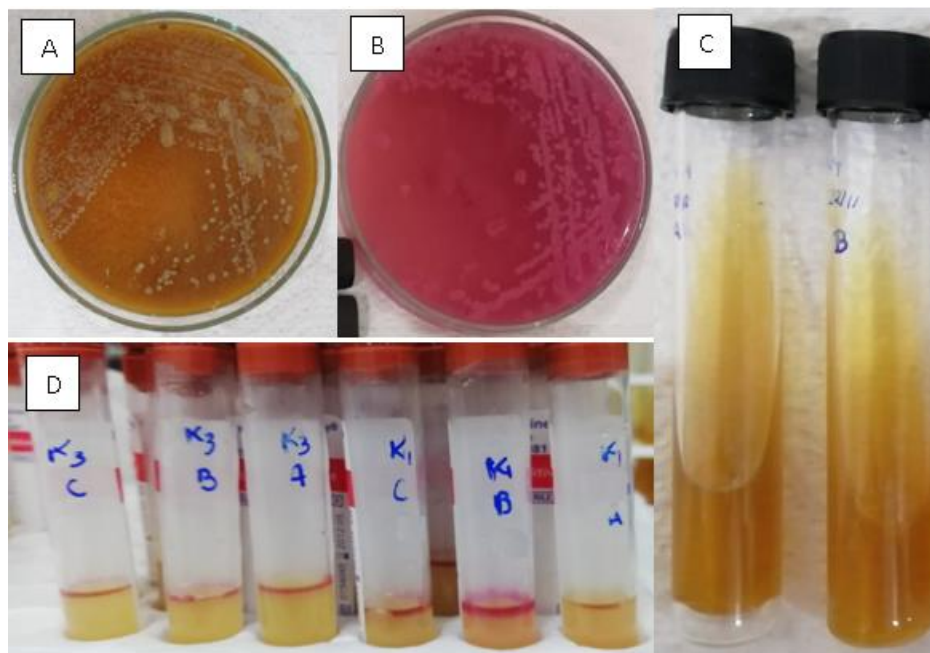
### Identificación de enterobacterias

El aspecto de las colonias de *Escherichia coli* en Agar MacConkey (Titan Biotech) se observaron con colonias rosadas estrelladas convexas en su interior y el medio bajo ellas se tornó rosado por su capacidad de fermentar la lactosa (Figura 7B), con respecto a las colonias de *Escherichia coli* en Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (MERCK) las colonias se observaron color crema y achatadas (Figura 7A); la textura de las colonias de *Escherichia coli* en ambos medios fue rugosa y con un olor a queso.

Las pruebas bioquímicas para comprobar y revelar la presencia de *E. coli* mostraron ser degradadoras de lactosa por el aspecto A/A y con gas en el medio de TSI (Figura 7C), para la prueba de indol, también mostraron ser positivas por la presencia del anillo rojo característico de bacterias capaces de romper el indol del aminoácido triptófano por desaminación reductiva (Figura 7D).

**Figura 7.**

*Identificación de Escherichia coli en medios selectivo-diferencial*



*Nota:* Agar Xilosa Lisina Desoxicolato colonias color crema y achatadas (A) en Agar MacConkey colonias rosadas estrelladas convexas en su interior (B). Pruebas bioquímicas: aspecto A/A y con gas en el medio TSI, capacidad de las bacterias para fermentar azúcares (C), indol positivo por presencia del anillo rojo, capacidad de las bacterias para romper el anillo del triptófano (D).

### **Sensibilidad antibiótica**

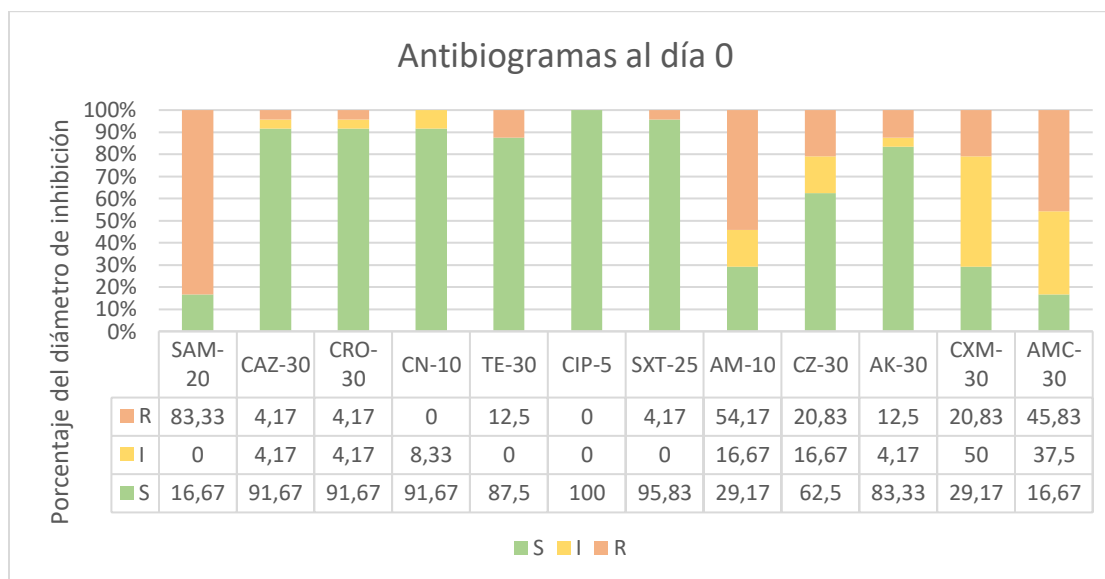
#### ***Estadística descriptiva***

La evaluación de las 12 muestras con  $\beta$  – lactamasas, cefalosporinas, aminoglucósidos, tetraciclinas, fluoroquinolonas, inhibidores de la vía del folato y penicilinas al d0 mostró que k6 fue la única resistente a todas las cefalosporinas (CAZ-30,CRO-30,CZ-30 y CXM - 30), sin embargo, no hubo ninguna interacción con amoxicilina más ácido clavulánico(AMC-30) utilizando el Método de Jarlier que revelaría la presencia de BLEE; por otra parte k3 también se reveló como una posible presencia de BLEE

porque mostró resistencia intermedia para Ceftazidima (CAZ-30; 4,17%(24,66-28,18)) y Ceftriaxona (CRO-30;4,17%(31,71-38,79)) y para el caso de Cefazolina(CZ-30) y Cefuroxima (CXM-30) no fue la única muestra en presentar resistencia sino que se obtuvo un 20,83%(20,72-27,08; 17,38- 23,21) de resistencia para ambos antibióticos pero a pesar de ello no hubo ninguna interacción con amoxicilina más ácido clavulánico(AMC-30); con respecto a tetraciclina (TE-30) k1, k3 y k6 mostraron resistencia(12,5%(23,04 – 33,21)); k1 fue el único que mostro resistencia por trimetoprima/sulfametoxazol (SXT-25; 4,17%(28,78-36,88)); en el caso de la ampicilina(AM-10) más de la mitad se mostraron resistentes (54,17%(7,04- 15,38)) y k8 y k9 con resistencia intermedia(16,67%); por otra parte para la amoxicilina más ácido clavulánico(AMC-30) casi la mitad se mostró resistente (45,83%(7,42 – 13,74)), el 37,5% de resistencia intermedia y solo 16,67% fueron sensibles; la resistencia de ampicilina/sulbactam (SAM-20) se reveló en la mayoría de las muestras (83,33%(8,34 – 14,83)); y por último la mayoría de las muestras se revelaron sensibles para gentamicina, ciprofloxacina y amikacina (Figura 8).

Figura 8.

Proporciones agrupadas de aislados de resistencia a antibióticos al día 0 en perros por diámetro de inhibición

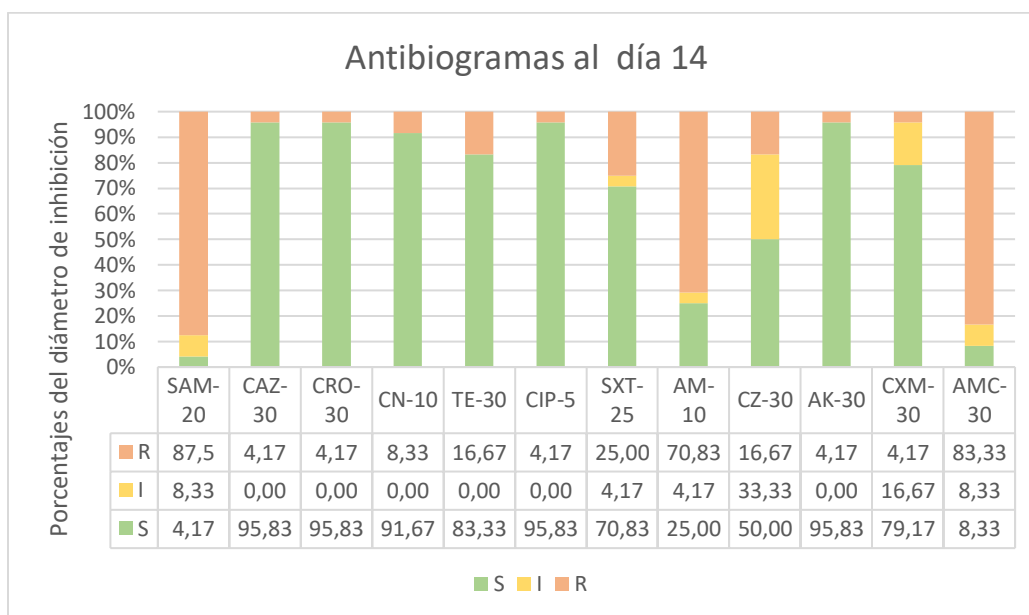


Para el d14 la mayoría de las muestras siguieron mostrando resistencia a ampicilina/sulbactam(SAM-20; 87,5%(3,17 – 8,24)); resultado semejante a la resistencia a amoxicilina más ácido clavulánico (AMC-30; 83,33%(5,48 – 11,77)) en la mayoría de las muestras a excepción de k2 y k12 que fueron sensibles(8,33%); en el caso de la resistencia a las cefalosporinas con posible presencia de BLEE solo k3 reveló este comportamiento con resistencia a CAZ-30,CRO-30, CXM-30 y CZ – 30 (24,91-30,59; 33,81 – 41,94; 21,46 – 26,63 y 19.74 – 25,17)) pero tampoco hubo ninguna interacción con amoxicilina más ácido clavulánico utilizando el Método de Jarlier; las muestras presentaron resistencia del 16,87% y resistencia intermedia del 33,33% a cefazolina (CZ – 30; 19.74 – 25,17); k2 y k11 mostraron resistencia a gentamicina(CN-10;8,33%(20,98 – 23,10)); k5,k6 y k11 mostraron resistencia a tetraciclina(TE-30 ;16,67%(17,86 – 28,05)); k3 fue la única muestra que mostró resistencia a ciprofloxacina(CIP-5 ;4,17%(40.84 – 46,82)); el ¼ de las muestras mostraron resistencia a trimetoprima/sulfametoxazol (SXT-25; 25%(19,71 – 33,46));la mayoría de las muestras mostraron

resistencia a ampicilina(AM-10;70,83%(5,48 – 13,10)) ; y k2 fue la única que mostró resistencia a amikacina(AK-30;4,17%(22,17 – 25,42)) (Figura 9).

**Figura 9.**

*Proporciones agrupadas de aislados de resistencia a antibióticos al día 14 en perros por diámetro de inhibición.*



Finalmente, para el día 28 la resistencia por ampicilina/sulbactam (SAM-20;91,67%(5,95 – 11,47)) prevaleció en la mayoría de las muestras, a excepción de k8 y k10 que fueron sensibles (8,33%); no se revelaron resistencia por cefalosporinas a excepción de la resistencia por cefazolina(CZ-30;4,17%(21,46 - 24,21)) en k11 y resistencia intermedia para la mitad de las muestras (50%) y resistencia intermedia por cefuroxima (CXM-30,20,83%(22,87-24,55)); k1 y k3 mostraron resistencia a tetraciclina(TE-30,12,50%(19, 31 – 27,27)); k1 y k5 mostraron resistencia por trimetoprima/sulfametoxazol(SXT-25, 8,33%(22,89 – 30,52)); para ampicilina (AM-10) el 29,17%(10,81 – 14,52) mostró resistencia y el 41,67% resistencia intermedia; más de la mitad de las muestras mostraron resistencia intermedia (62,50%(11,41 – 15,43)) y 1/3 de ellas fueron resistentes (29,17%) a amoxicilina

más ácido clavulánico(AMC-30); en el caso de la gentamicina(CN-10; 4,17%(16,46 – 19,79)) y amikacina (AK-30,4,17%(19,97 – 21,95)) solo k10 y k12, respectivamente mostraron resistencia intermedia y por último todas las muestras se revelaron sensibles para ciprofloxacina(CIP-5) (Figura 10).

**Figura 10.**

*Proporciones agrupadas de aislados de resistencia a antibióticos al día 28 en perros por diámetro de inhibición*

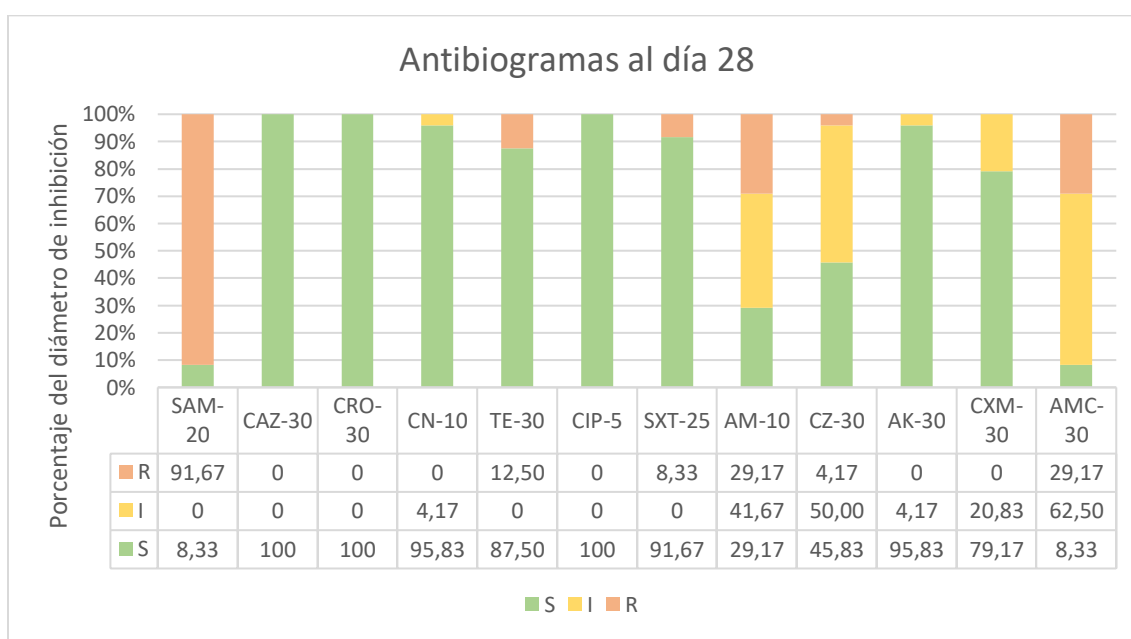


Tabla 11.

Patrones de susceptibilidad por las cefalosporinas de los aislados de las heces fecales de canes.

Especie bacteriana aislada			Número de aislados resistentes	Número total de aislamientos	Nivel de resistencia (%) con IC del 95%	Patrón de susceptibilidad
Tiempo	Antibióticos					
<i>Escherichia coli</i>	d0	CAZ-30	1	24	4,17 (24,66 - 28,18)	Muy sensible
		CRO-30	1	24	4,17 (31,71 - 38,79)	Muy sensible
		CZ-30	5	24	20,83 (20,67 - 27,08)	Sensible
		CXM-30	5	24	20,83 (17,38 - 23,21)	Intermedia
	d14	CAZ-30	1	24	4,17 (24,91 - 30,59)	Muy sensible
		CRO-30	1	24	4,17 (33,81 - 41,94)	Muy sensible
		CZ-30	4	24	16,67 (19,74 - 25,17)	Sensible
		CXM-30	1	24	4,17 (21,46 - 26,63)	Sensible
	d28	CAZ-30	0	24	0,00 (26,99 - 29,93)	Muy sensible
		CRO-30	0	24	0,00 (31,77 - 35,32)	Muy sensible
		CZ-30	1	24	4,17 (21,46 - 24,21)	Sensible
		CXM-30	0	24	0,00 (22,87 - 24,55)	Sensible

Tabla 12.

Patrones de susceptibilidad por las  $\beta$  – lactamasas, aminoglucósidos, tetraciclinas, fluoroquinolonas, inhibidores de la vía del folato y penicilinas de los aislados de las heces fecales de canes.

Especie bacteriana aislada			Número de aislados resistentes	Número total de aislamientos	Nivel de resistencia (%) con IC del 95%	Patrón de susceptibilidad
Tiempo	Antibióticos					
<i>Escherichia coli</i>	do	SAM-20	20	24	83,33 (8,34 - 14,83)	Resistente
		CN-10	0	24	0,00 (19,29 - 20,88)	Muy sensible
		TE-30	3	24	12,50 (23,04 - 33,21)	Muy sensible



Especie bacteriana aislada		Número de aislados resistentes	Número total de aislamientos	Nivel de resistencia (%) con IC del 95%	Patrón de susceptibilidad	
Tiempo	CIP-5	0	24	0,00 (41,07 - 46,43)	Muy sensible	
	SXT-25	1	24	4,17 (28,79 - 36,88)	Muy sensible	
	AM-10	13	24	54,17 (7,04 - 15,38)	Resistente	
	AK-30	3	24	12,50 (21,75 - 24,00)	Muy sensible	
	AMC-30	11	24	45,83 (7,42 - 13,74)	Muy resistente	
	SAM-20	21	24	87,50 (3,17 - 8,24)	Muy resistente	
	CN-10	2	24	8,33 (20,98 - 23,10)	Muy sensible	
	TE-30	4	24	16,67 (17,86 - 28,05)	Muy sensible	
	d14	CIP-5	1	24	4,17 (40,84 - 46,82)	Muy sensible
		SXT-25	6	24	25,00 (19,71 - 33,46)	Muy sensible
		AM-10	17	24	70,83 (5,48 - 13,10)	Muy resistente
		AK-30	1	24	4,17 (22,17 - 25,42)	Muy sensible
		AMC-30	20	24	83,33 (5,48 - 11,77)	Muy resistente
		SAM-20	22	24	91,67 (5,95 - 11,47)	Muy resistente
		CN-10	0	24	0,00 (16,46 - 19,79)	Muy sensible
	d28	TE-30	3	24	12,50 (19,31 - 27,27)	Muy sensible
		CIP-5	0	24	0,00 (32,47 - 39,78)	Muy sensible
		SXT-25	2	24	8,33 (22,89 - 30,52)	Muy sensible
		AM-10	7	24	29,17 (10,81 - 14,52)	Resistente
		AK-30	0	24	0,00 (19,97 - 21,95)	Muy sensible
		AMC-30	7	24	29,17 (11,41 - 15,43)	Resistente

### ***Estadística inferencial***

El test de comparaciones múltiples de Duncan muestra que no hubo diferencias significativas (valor-  $p = 0,552$ ) en los patrones de susceptibilidad de las 72 muestras evaluadas durante el periodo experimental (Tabla 13).

**Tabla 13.**

Test de Duncan de los patrones de susceptibilidad durante el periodo experimental.

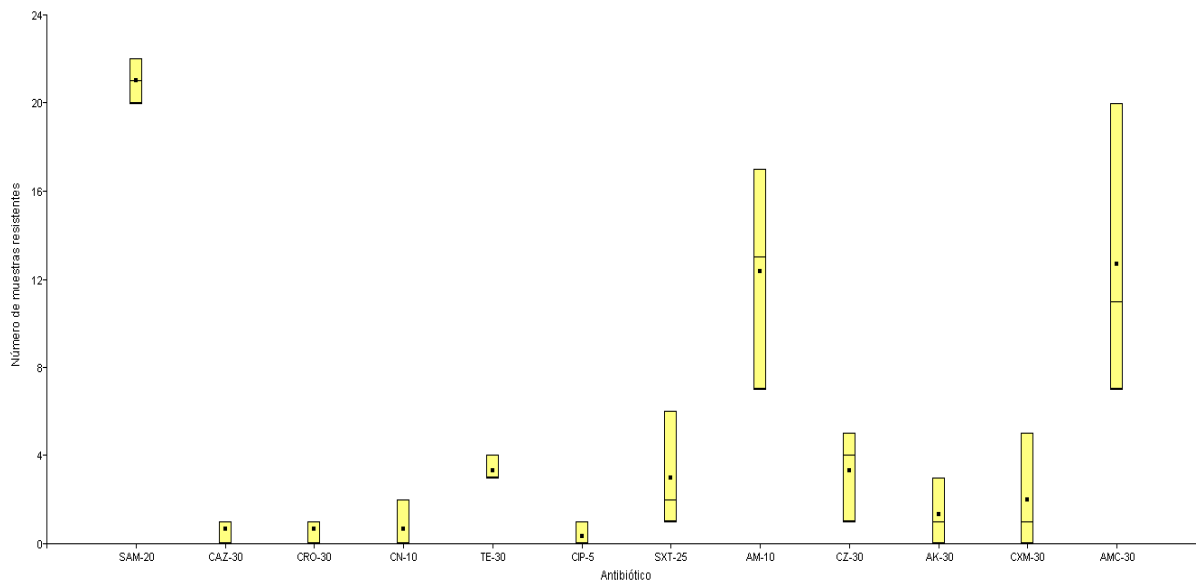
Día	Medias	n	E.E	
0	5,25	12	1,99	A
14	6,58	12	1,99	A
28	3,50	12	1,99	A

**Nota:** Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (valor  $-p > 0,05$ ).

El Box-Plot que describe el fenotipo de resistencia de *Escherichia coli* aislada de las heces fecales de canes de todos los antibióticos evaluados (Figura 11) muestra que el antibiótico que más muestras resistentes tuvo durante el periodo experimental fue ampicilina/sulfactam (SAM-20; 3,17 – 14,83), seguida de amoxicilina más ácido clavulánico (AMC-30; 7,42 – 15,43) y ampicilina (AM-10; 7,04 – 15,38) en 66, 63 y 48 muestras de las 72 evaluada, respectivamente.

**Figura 11.**

Resistencia fenotípica de *Escherichia coli* en el periodo experimental.



Los resultados obtenidos se aseveran con lo obtenido en el test de comparaciones múltiples de Duncan que analiza las medias del número de muestras resistentes (Tabla 14) puesto que la ampicilina/sulfactam (SAM-20), amoxicilina más ácido clavulánico (AMC-30) y ampicilina (AM-10) se encuentran en dos grupos claramente diferenciados (B y C) del grupo de antibióticos que permanecieron sensibles durante todo el periodo experimental (A).

**Tabla 14.**

Test de Duncan de número de muestras resistentes por cada antibiótico puesto a prueba.

Antibiótico	Medias	E.E	
CIP – 5	0,33	1,62	A
CAZ – 30	0,67	1,62	A
CN – 10	0,67	1,62	A

CRO – 30	0,67	1,62	A	
AK – 30	1,33	1,62	A	
CXM – 30	2,00	1,62	A	
SXT – 25	3,00	1,62	A	
TE – 30	3,33	1,62	A	
CZ – 30	3,33	1,62	A	
AM – 10	12,33	1,62		B
AMC – 30	12,67	1,62		B
SAM – 20	21,00	1,62		C

---

**Nota:** Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (valor –  $p > 0,05$ ).

### Capítulo V: Discusión

En la presente investigación se reportó que a los 28 días de administración de kéfir de leche no se observó diferencias significativas de la resistencia fenotípica de *Escherichia coli* aislada de heces fecales de canes (valor –  $p = 0,552$ ), además, no se manifestó ningún efecto adverso clínicamente evidente. Se dice que, entre las propiedades beneficiosas para la salud, el kéfir de leche ha reportado tener propiedades antibacterianas (Bourrie *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2016; Rosa *et al.*, 2017a; Slattery *et al.*, 2019); sin embargo, esto no se ha estudiado con profundidad en perros y entre las investigaciones existentes es complicado comparar y extrapolar resultados debido a que se utilizan diferentes cepas de diferentes aislados, diferentes formas de aplicación, de dosis, tiempos, diferentes razas y edades de perros, diferente estado fisiológico y otras variables (Gaspardo *et al.*, 2020).

La mayoría de las especies de *Lactobacillus* derivadas del kéfir han revelado ser potentes antibacterianos, por ejemplo, *L. kefiri* ha demostrado tener la capacidad adherirse a las células caco-2 e inhibir la adherencia de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* O157:H7 (A. a. Hugo *et al.*, 2008; A.

Santos *et al.*, 2003). Otras especies como *L. acidophilus* y *L. kefiranofaciens*, también cepas de *S. thermophilus* han revelado actividad antimicrobiana contra toda una gama de organismos patógenos, incluyendo *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. flexneri*, *P. aeruginosae* y *Y. enterocolitica* (Golowczyc *et al.*, 2008; A. a. Hugo *et al.*, 2008; A. Santos *et al.*, 2003; Yüksekdağ *et al.*, 2004).

Estudios realizados en perros utilizan cepas probióticas de aislados diferentes al kéfir de leche, pero tienen en común que se trata de las mismas especies de *Lactobacillus*, de estos estudios muy pocos analizan la presencia de sustancias antimicrobianas, por ejemplo, Stropfová *et al.*, (2012, 2018) a través de un análisis de Ácidos Grasos de Cadena Corta (SCFA) reportó altas concentraciones en las heces de perros de ácidos propiónico, acético, fórmico, butírico y láctico a partir del día 14 de suplementación, la administración de la investigación del 2012 se realizó en forma liofilizada con 2 gr/día ( $10^8$  UFC/g) de la cepa canina *L. fermentum* AD1-CCM7421, en cambio, para la del año 2018 se utilizó una dosis de 1 mL/día ( $4 \times 10^9$  UFC/mL) de la cepa canina *L. fermentum* CCM 7421; cepas a las que se les comprobó ser aptas a resistir el ambiente intestinal. Por otra parte, Gómez-Gallego *et al.*, (2016) suplemento a perros una leche agria con tres especies de *Lactobacillus* spp. ( $2 \times 10^9$  UFC/mL), la cual redujo enteropatógenos potenciales como *Clostridium perfringens* productora de toxinas  $\alpha$ , y *Enterococcus faecium*.

Hasta la fecha no existe ningún estudio que haya evaluado la influencia del kéfir de leche en la resistencia fenotípica de *Escherichia coli* o del microbiota intestinal de los perros.

En la actualidad, solo existen dos ensayos clínicos publicados en perros Kim *et al.*, (2019) en donde evaluaron el efecto modulador del kéfir de leche en la microbiota intestinal canina, en donde demostró que es capaz de modular la microbiota a partir de la segunda semana de suplementación continua; y, el segundo por Gaspardo *et al.*, (2020) que evaluó la seguridad y facilidad de administración

de *Lactobacillus kefir* (bacteria láctica que conforma el 80% del consorcio) en perros sanos y su capacidad para regular la microbiota intestinal con su consecuente secreción de IgA, sin embargo, no lograron demostrar el efecto deseado.

*Escherichia coli* al ser un microorganismo oportunista con respecto a la evolución se ha adaptado de tal manera que ha adquirido elementos genéticos o mutaciones que funcionan como factores de virulencia y aptitud, los que se expresan por medio de elementos genéticos móviles como transposones, integrones o plásmidos que codifican para genes de resistencia a varios antibióticos como sulfonamida (*sul1* y *sul2*), aminoglucósidos (*chuA* y *ratA*) (Abdelhalim *et al.*, 2020), fluoroquinolonas (*Gyr A*, *Gyr B*, *parC* y *parE*) (Adamus-Białek *et al.*, 2018), quinolonas (*qnrA*, *qnrB* y *qnrS*), fosfomicina (*fosA*, *fosC2* y *fosA3*) (Düzgün *et al.*, 2019), estreptomycin (*strA*, *strB* y *aadA2*), y a tetraciclina (*tetA* y *tetB*) (Guardabassi *et al.*, 2004; Lanz *et al.*, 2003), actividades con la que ha podido propagarse en diferentes ambientes y medios; por otra parte, varias investigaciones han reportado la presencia *Escherichia coli* multirresistente en heces fecales de canes con resistencia a  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE),  $\beta$ -lactamasas AmpC mediadas por plásmidos (pAmpCs), carbapenémicos y a las fosfoetanolamina transferasas (resistencia a la colistina móvil, *mcr*) (Guerra *et al.*, 2014; Ortega-Paredes *et al.*, 2019; Procter *et al.*, 2014; P. L. C. Zhang *et al.*, 2018). Es por esta razón que esta bacteria se encuentra en la lista de la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las 12 familias de bacterias que son un peligro para la salud humana (Tagliabue & Rappuoli, 2018).

Esta evidencia respalda los resultados obtenidos en la presente investigación puesto que aunque no se hayan obtenido  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) mediante el Método de Jarlier, dos de los doce perros al día cero mostraron una inclinación de pertenecer a este grupo por la resistencia mostrada a la mayoría de las cefalosporinas evaluadas (CAZ-30, CRO-30, CZ-30 y CXM - 30) y a otros antibióticos como ampicilina (AM-10: 54,17% (7,04- 15,38)), amoxicilina más ácido clavulánico (AMC-30: 45,83% (7,42 – 13,74)), ampicilina/sulbactam (SAM-20: 83,33% (8,34 – 14,83)) y tetraciclina (TE-30:

12,50%(23,04 - 33,21)) , datos que nos dan un indicio de la posible presencia de bacterias multirresistentes pero que se necesitan pruebas más específicas, por ejemplo, una secuenciación de tipificación de multilocus, qPCR o FISH para poder ser reveladas (Pilla & Suchodolski, 2020). Además, se cuenta con el hecho que la *E. coli* productora de BLEE puede formar parte de la microbiota intestinal del huésped sano durante muchos años hasta que se produzca una infección y el sistema inmunológico del huésped este comprometido y sin duda su presencia se revelaría, en este caso los perros se encontraban sanos y no hubo evidencia de algún tipo de infección por lo que se puede decir que la presencia de *E. coli* productora de BLEE pudo ser mínima (Tellevik *et al.*, 2016) o mantenerse así durante la suplementación de kéfir de leche al estarle administrando microorganismos capaces de modular la microbiota intestinal evitando la presencia de posibles infecciones como es lo que demostró Kim *et al.*, (2019) en su investigación. Otra hipótesis podría atribuirse al hecho de la toma de las muestras puesto que la toma se realizó inmediatamente de una sola defecación , por lo que la probabilidad de haber tomado una cepa productora de BLEE también fue mínima

Por otra parte, los resultados de la resistencia evidenciada al día 0 en algunos aislados del presente estudio por tetraciclina (TE-30), ampicilina/sulfactam (SAM-20), ampicilina (AM-10) y amoxicilina más ácido clavulánico(AMC-30) corroboran con los datos mostrados en Albán *et al.*, (2020) y Ortega-Paredes *et al.*, (2019) que también aislaron *E. coli* de las heces fecales de perros para ver su resistencia fenotípica y en ambos estudios existe la resistencia por los cuatro antibióticos nombrados. Sin embargo, en el caso de Albán *et al.*, (2020) los perros analizados fueron tanto enfermos como sanos, jóvenes como geriátricos y en ambos casos mostraron resistencia por ampicilina/sulbactam, con lo que se puede afirmar que la presencia de bacterias resistentes no depende de la edad ni el estado fisiológico como fue lo evidenciado en la presente investigación puesto que se contó con perros sanos entre adultos y geriátricos y la mayoría de ellos presentaron dicha resistencia. Lo que quiere decir que la

resistencia a antimicrobianos (RAM) ya no solo se adquiere por el medio ambiente o el uso excesivo de estos sino también por la transferencia vertical entre madre y feto (Patangia *et al.*, 2022).

Aun no se ha revelado cual es el real vehículo de transmisión de la resistencia a antimicrobianos (RAM), solo se cuenta con el hecho de que es una transmisión de ir y venir entre mascotas, humanos y ambiente con una tasa de transmisión mínima de *Escherichia coli* multirresistente del 8,8% entre mascota-humano (Harada *et al.*, 2012), pero este fenómeno no solo se da por este hecho sino también porque *E. coli* posee muchos genes de resistencia que se encuentran en los plásmidos, lo que le da una ventaja de propagación horizontal entre las diferentes bacterias que se encuentren en su entorno (Card *et al.*, 2017; Puvača & de Llanos Frutos, 2021; Tagliabue & Rappuoli, 2018). Como fue el caso reportado por Loayza *et al.*, (2018) en Ecuador para averiguar si la infección peritoneal de un niño fue adquirida por transferencia horizontal del gen *mcr-1* de *E. coli* proveniente de las mascotas de su hogar y sin lugar a duda este hecho fue afirmado puesto que el plásmido que contenía dicho gen se encontraba en todos los aislados tanto animal, humano como ambiente, lo que quiere decir que este gen se transmitió horizontalmente entre los diferentes fenotipos de resistencia de *E. coli* de la mascota en el hogar del niño.

Por otra parte, describir con certeza de donde los perros han adquirido cierta resistencia es difícil de mostrar, puesto que las bacterias resistentes se encuentran en todas partes, pero, existen indicios de su procedencia, por ejemplo, la dieta de los perros con comida cruda (Davies *et al.*, 2019) o balanceada (Finisterra *et al.*, 2021) ha revelado la presencia de bacterias multirresistentes, así como también, el hecho de que los antibióticos se usan sin regularización en el ámbito veterinario y no solo por esto sino que la resistencia a los antimicrobianos se ha dado ya como un proceso de evolución natural que se encuentra en todos los ambientes y ha generado cepas multirresistentes que han ejercido una presión selectiva en las poblaciones bacterianas por el uso excesivo e inapropiado de antibióticos (Rhys-Davies & Ogden, 2020).



La subsistencia de bacterias autóctonas y no autóctonas de la microbiota del huésped como *Escherichia coli* pertenecientes al filo Proteobacteria que es sin duda las que más prevalecen en el sistema gastrointestinal canino (yeyuno:46%; duodeno: 26,6%; estómago: 96%; colon: *E. coli* (1,4%); heces: 5 - 6%)(Grzeńkowiak *et al.*, 2015a; Pilla & Suchodolski, 2020; Schmitz & Suchodolski, 2016) a pesar de que se esté efectuando una suplementación probiótica, este hecho es muy interesante, debido a que cuando se da una suplementación con kéfir de leche este provee al sistema gastrointestinal de bacterias ácido lácticas las cuales acidifican el intestino del huésped por la producción de muchos ácidos orgánicos causando un ambiente desfavorable para proteobacterias como *E. coli* (Dharmasena *et al.*, 2016), además, estas bacterias ácido lácticas compiten con las *Enterobacterias* mediante la producción de sustancias bacteriocinas o exopolisacáridos antimicrobianos para contrarrestarlos (Jeong *et al.*, 2017), sin embargo, las *Enterobacterias* prevalecen, hecho que se puede correlacionar con que este tipo de bacterias ya que están estrechamente relacionadas a enfermedades inflamatorias intestinales en perros, trastornos a los que los perros son muy susceptibles por factores como una mala nutrición en las diferentes etapas de crecimiento, constante cambio de comida, consumo de desechos o restos de comida y consumo de utensilios de plástico, madera u otro material, por lo que controlar la población de *Enterobacterias* mediante la administración de kéfir de leche podría ser poco relevante o causar pocas modificaciones con el hipotético caso de que esto pueda cambiar si se lo suplementara de por vida o en grandes cantidades y si se utilizara algunos tipos de microorganismos en específico, (Kim *et al.*, 2019; Vázquez-Baeza *et al.*, 2016), este hecho se evidencia en la investigación de Kim *et al.*, (2019) puesto que la suplementación de kéfir de leche por dos semanas pudo disminuir significativamente la presencia de *Fusobacterias*, *Firmicutes*, *Ruminococcaceae*, *Selenomonadaceae* y *Sutterellaceae* pero menos de *Enterobacteriaceae* .

Dentro de este hecho también hay que considerar lo dicho por varios autores con respecto a la eficiencia digestiva de los nutrientes en los diferentes periodos de edad de los perros, sin embargo, la

mayoría de los perros sin importar la raza mantienen una eficiencia digestiva a medida que envejecen, tomando en cuenta solo ciertos aspectos como la secreción de ácido clorhídrico y producción de ácidos biliares que si disminuyen, pero estos tienen poca relevancia al digerir y adquirir los nutrientes de los suplementos alimenticios, pero también existe el hecho de si el perro tuvo o no varios trastornos gastrointestinales a lo largo de su vida, que sin lugar a duda van a exhibir una disminución en la digestibilidad aparente de los nutrientes (Harper, 1998) y en el caso de este estudio no se puede concluir con este hecho debido a que los perros pertenecen a una asociación de rescate animal que no tuvo un seguimiento de la salud intestinal de los canes desde su nacimiento, sin embargo, Kim *et al.*, (2019) en su estudio también incluyó perros de diferente sexo y edad y pese a ello el kéfir moduló con éxito la microbiota intestinal de cada uno de ellos.

Los hallazgos obtenidos en esta investigación se vinculan mucho con este hecho porque se analizó solo la resistencia fenotípica de *Escherichia coli* y se demostró que el kéfir de leche no influyó en su actividad durante los 28 días de suplementación, los patrones de susceptibilidad se encontraron siempre en los mismos intervalos de confianza al 95%, también se dio el hecho que los datos se mostraron cada vez más simétricos lo que podría interpretarse con la idea hipotética nombrada anteriormente de que quizás se necesita más cantidad o concentración, tiempo y microorganismos específicos para poder obtener los resultados deseados.

## Capítulo VI: Conclusiones y Recomendaciones

### Conclusiones

- Los canes consumieron el 99% de los 60 mL de suplementación diaria de kéfir de leche establecida a un pH de 4 por un periodo de 28 días sin mostrar ningún efecto adverso clínicamente evidente.
- Se aisló enterobacterias de las heces fecales de canes mediante medios selectivos-diferenciales por la coloración rosada del medio y las colonias estrelladas convexas en su interior en el Agar MacConkey (MKL), y colonias color crema y achatadas en el Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), con textura rugosa y olor a queso en ambos medios.
- Las pruebas bioquímicas comprobaron y revelaron la presencia de *Escherichia coli* en los 180 aislados por el aspecto A/A y presencia de gas en TSI e indol positivo.
- El método de Kirby Bauer reveló que 4 (4,17%) de las 24 muestras al día cero mostraron un fenotipo de multiresistencia, sin embargo, el método de Jarlier no reveló la presencia de *Escherichia coli* productora de BLEE, por otra parte, se reveló resistencia durante todo el periodo de experimental por ampicilina/sulfactam (SAM-20; 3,17 – 14,83), ampicilina (AM-10; 7,04 – 15,38) y amoxicilina más ácido clavulánico (AMC-30; 7,42 – 15,43) en 66,48 y 63 muestras de las 72 evaluada, respectivamente.
- La suplementación probiótica de kéfir de leche a 12 perros no reveló cambios significativos en la resistencia fenotípica de *Escherichia coli* aislada de heces fecales (valor  $-p = 0,552$ ).

## Recomendaciones

- Estandarizar protocolos de administración de kéfir de leche a perros sanos para evaluar el potencial efecto sobre el equilibrio del microbiota intestinal.
- Realizar un análisis de Ácidos Grasos de Cadena Corta (SCFA) de las heces fecales de canes para asegurar la producción ácidos propiónico, acético, fórmico, butírico y láctico provenientes de las bacterias ácido lácticas y acéticas del kéfir de leche para darle robustes a la investigación.
- Aumentar los días de suplementación y el número de repeticiones para poder establecer una estadística y resultados más robustos.
- Analizar el fenotipo de resistencia de otras especies bacterianas.
- Identificar la presencia de bacterias multirresistentes mediante técnicas más robustas de metagenómica

## Capítulo VII: Bibliografía

- Abdelhalim, K. A., Uzel, A., & Gülşen Ünal, N. (2020). Virulence determinants and genetic diversity of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) strains isolated from patients with Crohn's disease. *Microbial Pathogenesis*, *145*, 104233. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104233>
- Abu-Salem, F., Mohamed, R., Gibriel, A., & Rasmy, N. (2014). *Levels of Some Antinutritional Factors in Tempeh Produced From Some Legumes and Jojobas Seeds*. *8*, 280-285.
- ACHIPIA. (2017). *Escherichia coli productora de toxina Shiga (STEC)*. <https://www.achipia.gob.cl/wp-content/uploads/2018/03/Ficha-Peligro-07-STEC-v01.pdf>
- Adamus-Białek, W., Baraniak, A., Wawszczak, M., Głuszek, S., Gad, B., Wróbel, K., Bator, P., Majchrzak, M., & Parniewski, P. (2018). The genetic background of antibiotic resistance among clinical uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Molecular Biology Reports*, *45*(5), 1055-1065. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4254-0>
- Afepadi. (2018). *Complementos alimenticios para mascotas. ¿Nueva línea de negocio para la industria?* Asociación de empresas de Dietéticos y Complementos Alimenticios. <https://www.afepadi.org/index.php/noticias/item/406-complementos-alimenticios-para-mascotas-prometedora-linea-de-negocio-para-la-industria>
- Ahmed, Z., Wang, Y., Ahmad, A., Khan, S. T., Nisa, M., Ahmad, H., & Afreen, A. (2013). Kefir and health: A contemporary perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *53*(5), 422-434. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.540360>
- Albán, M. V., Núñez, E. J., Zurita, J., Villacís, J. E., Tamayo, R., Sevillano, G., Villavicencio, F. X., & Calero-Cáceres, W. (2020). Canines with different pathologies as carriers of diverse lineages of *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* and clinically relevant  $\beta$ -lactamases in central Ecuador. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *22*, 182-183. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.05.017>

- Alekshun, M. N., & Levy, S. B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128(6), 1037-1050. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.004>
- Alpizar Olivares, Y. (2000). La penicilina y sus derivados como agentes desencadenantes de la respuesta inmune. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 16(2), 99-104.
- Altay, F., Karbancioglu-Güler, F., Daskaya-Dikmen, C., & Heperkan, D. (2013). A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: Microbiota, fermentation process and quality characteristics. *International Journal of Food Microbiology*, 167(1), 44-56. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.016>
- Andersen, B. M. (2019). Microbes, Transmission Routes and Survival Outside the Body. En B. M. Andersen (Ed.), *Prevention and Control of Infections in Hospitals: Practice and Theory* (pp. 23-28). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-99921-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-99921-0_3)
- Aryana, K. J., & Olson, D. W. (2017). A 100-Year Review: Yogurt and other cultured dairy products. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 9987-10013. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12981>
- Barrero Cuevas, L. (2016). *Microbiología clínica*.
- BD. (2015). *BBL TSI Agar Slants. Procedimientos de control de calidad. TSI Agar (Triple Sugar Iron Agar) (agar triple azúcar hierro)*. <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=22772>
- BD. (2017). *Instrucciones de uso – Medios en Placa listos para usar. BD Mueller Hinton II Agar*. <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8774>
- Bekar, O., Yilmaz, Y., & Gulden, M. (2011). Kefir improves the efficacy and tolerability of triple therapy in eradicating *Helicobacter pylori*. *Journal of Medicinal Food*, 14(4), 344-347. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0099>
- Bhullar, K., Waglechner, N., Pawlowski, A., Koteva, K., Banks, E. D., Johnston, M. D., Barton, H. A., & Wright, G. D. (2012). Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One*, 7(4), e34953. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034953>

- Bolla, P. A., Abraham, A. G., Pérez, P. F., & de Los Angeles Serradell, M. (2016). Kefir-isolated bacteria and yeasts inhibit *Shigella flexneri* invasion and modulate pro-inflammatory response on intestinal epithelial cells. *Beneficial Microbes*, 7(1), 103-110.  
<https://doi.org/10.3920/BM2015.0061>
- Bourély, C., Cazeau, G., Jarrige, N., Leblond, A., Madec, J. Y., Haenni, M., & Gay, E. (2019). Antimicrobial resistance patterns of bacteria isolated from dogs with otitis. *Epidemiology and Infection*, 147, e121. <https://doi.org/10.1017/S0950268818003278>
- Bourrie, B. C. T., Willing, B. P., & Cotter, P. D. (2016). The Microbiota and Health Promoting Characteristics of the Fermented Beverage Kefir. *Frontiers in Microbiology*, 7, 647.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00647>
- Britania. (2016). *Nutritivo Caldo*.  
[https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_6070769bd7fef.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6070769bd7fef.pdf)
- Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>
- Cantón, R. (2010). Lectura interpretada del antibiograma: Una necesidad clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(6), 375-385. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.01.001>
- Carbajo, M. (2021). *Alimentos para Mascotas, Proyecciones y Tendencias para la Industria en 2021— América Latina y el Caribe*. <https://allextruded.com/entrada/alimentos-para-mascotas-proyecciones-y-tendencias-para-la-industria-en-2021-24259>
- Card, R. M., Cawthraw, S. A., Nunez-Garcia, J., Ellis, R. J., Kay, G., Pallen, M. J., Woodward, M. J., & Anjum, M. F. (2017). An In Vitro Chicken Gut Model Demonstrates Transfer of a Multidrug Resistance Plasmid from *Salmonella* to Commensal *Escherichia coli*. *MBio*, 8(4), e00777-17.  
<https://doi.org/10.1128/mBio.00777-17>

- Carnivores, Omnivores & Herbivores. (2017, enero 14). *Dr. Bill's Pet Nutrition*.  
<https://drbillspetnutrition.com/carnivores-omnivores-herbivores/>
- Casewell, M., Friis, C., Marco, E., McMullin, P., & Phillips, I. (2003). The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(2), 159-161. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg313>
- Codex Alimentarius. (2003). *Norma para leches fermentadas. CXS 243-2003*. [https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B243-2003%252FCXS\\_243s.pdf](https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B243-2003%252FCXS_243s.pdf)
- D'Andrea, M. M., Arena, F., Pallecchi, L., & Rossolini, G. M. (2013). CTX-M-type  $\beta$ -lactamases: A successful story of antibiotic resistance. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 303(6-7), 305-317. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.008>
- Davey, P., Wilcox, M. H., Irving, W., & Thwaites, G. (2015). *Antimicrobial Chemotherapy*. Oxford University Press.
- Davies, R. H., Lawes, J. R., & Wales, A. D. (2019). Raw diets for dogs and cats: A review, with particular reference to microbiological hazards. *The Journal of Small Animal Practice*, 60(6), 329-339. <https://doi.org/10.1111/jsap.13000>
- Derrien, M., & van Hylckama Vlieg, J. E. T. (2015). Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. *Trends in Microbiology*, 23(6), 354-366. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.03.002>
- Dharmasena, M. N., Feuille, C. M., Starke, C. E. C., Bhagwat, A. A., Stibitz, S., & Kopecko, D. J. (2016). Development of an Acid-Resistant Salmonella Typhi Ty21a Attenuated Vector For Improved Oral Vaccine Delivery. *PLOS ONE*, 11(9), e0163511. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163511>



- Dimidi, E., Cox, S. R., Rossi, M., & Whelan, K. (2019). Fermented Foods: Definitions and Characteristics, Impact on the Gut Microbiota and Effects on Gastrointestinal Health and Disease. *Nutrients*, *11*(8), 1806. <https://doi.org/10.3390/nu11081806>
- Diosma, G., Romanin, D. E., Rey-Burusco, M. F., Londero, A., & Garrote, G. L. (2014). Yeasts from kefir grains: Isolation, identification, and probiotic characterization. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *30*(1), 43-53. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1419-9>
- Düzgün, A. Ö., Okumuş, F., Saral, A., Çiçek, A. Ç., & Cinemre, S. (2019). Determination of antibiotic resistance genes and virulence factors in *Escherichia coli* isolated from Turkish patients with urinary tract infection. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *52*. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0499-2018>
- El Comercio. (2019). *Nuevo censo de animales abandonados se realizará en parroquias de Quito*. <https://www.elcomercio.com/tendencias/censo-animales-abandonados-parroquias-quito.html>
- El Telégrafo. (2022). *Urbanimal de Quitumbe: 3 de cada 5 familias tienen una mascota*. <https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/quito/1/3-de-cada-5-familias-tienen-una-mascota>
- Evans, D. R., Griffith, M. P., Sundermann, A. J., Shutt, K. A., Saul, M. I., Mustapha, M. M., Marsh, J. W., Cooper, V. S., Harrison, L. H., & Van Tyne, D. (2020). Systematic detection of horizontal gene transfer across genera among multidrug-resistant bacteria in a single hospital. *ELife*, *9*, e53886. <https://doi.org/10.7554/eLife.53886>
- Fariñas, M. C., & Martínez-Martínez, L. (2013). Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: Enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *31*(6), 402-409. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.03.016>

- Filannino, P., Bai, Y., Di Cagno, R., Gobbetti, M., & Gänzle, M. G. (2015). Metabolism of phenolic compounds by *Lactobacillus* spp. During fermentation of cherry juice and broccoli puree. *Food Microbiology*, *46*, 272-279. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.018>
- Finisterra, L., Duarte, B., Peixe, L., Novais, C., & Freitas, A. R. (2021). Industrial dog food is a vehicle of multidrug-resistant enterococci carrying virulence genes often linked to human infections. *International Journal of Food Microbiology*, *358*, 109284. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109284>
- Finley, R. L., Collignon, P., Larsson, D. G. J., McEwen, S. A., Li, X.-Z., Gaze, W. H., Reid-Smith, R., Timinouni, M., Graham, D. W., & Topp, E. (2013). The scourge of antibiotic resistance: The important role of the environment. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *57*(5), 704-710. <https://doi.org/10.1093/cid/cit355>
- Galanakis, N., Giamarellou, H., Moussas, T., & Dounis, E. (1997). Chronic osteomyelitis caused by multi-resistant Gram-negative bacteria: Evaluation of treatment with newer quinolones after prolonged follow-up. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *39*(2), 241-246. <https://doi.org/10.1093/jac/39.2.241>
- Ganguly, N. K., Bhattacharya, S. K., Sesikeran, B., Nair, G. B., Ramakrishna, B. S., Sachdev, H. P. S., Batish, V. K., Kanagasabapathy, A. S., Muthuswamy, V., Kathuria, S. C., Katoch, V. M., Satyanarayana, K., Toteja, G. S., Rahi, M., Rao, S., Bhan, M. K., Kapur, R., & Hemalatha, R. (2011). ICMR-DBT Guidelines for Evaluation of Probiotics in Food. *The Indian Journal of Medical Research*, *134*(1), 22-25.
- Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (2010). Microbial Interactions in Kefir: A Natural Probiotic Drink. En *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria* (pp. 327-340). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780813820866.ch18>

- Gasbarrini, G., Bonvicini, F., & Gramenzi, A. (2016). Probiotics History. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 50, S116. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000697>
- Gaspardo, A., Zannoni, A., Turrioni, S., Barone, M., Sabetti, M. C., Zanoni, R. G., Forni, M., Brigidi, P., & Pietra, M. (2020). Influence of *Lactobacillus kefir* on Intestinal Microbiota and Fecal IgA Content of Healthy Dogs. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 146. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00146>
- Gaviria, J. (2016). *Alimentación general y especializada para mascotas en una empresa productora de alimentos balanceados para animales*. [http://repository.unilasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/1493/1/Alimentacion\\_general\\_e\\_especializada\\_mascotas.pdf](http://repository.unilasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/1493/1/Alimentacion_general_e_especializada_mascotas.pdf)
- Geisinger, E., & Isberg, R. R. (2017). Interplay Between Antibiotic Resistance and Virulence During Disease Promoted by Multidrug-Resistant Bacteria. *The Journal of Infectious Diseases*, 215(suppl\_1), S9-S17. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw402>
- Gogarten, J. P., & Townsend, J. P. (2005). Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(9), 679-687. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1204>
- Golowczyc, M. A., Gugliada, M. J., Hollmann, A., Delfederico, L., Garrote, G. L., Abraham, A. G., Semorile, L., & De Antoni, G. (2008). Characterization of homofermentative lactobacilli isolated from kefir grains: Potential use as probiotic. *The Journal of Dairy Research*, 75(2), 211-217. <https://doi.org/10.1017/S0022029908003117>
- Golowczyc, M. A., Mobili, P., Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (2007). Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *International Journal of Food Microbiology*, 118(3), 264-273. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.042>

- Granato, D., Barba, F. J., Bursać Kovačević, D., Lorenzo, J. M., Cruz, A. G., & Putnik, P. (2020). Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. *Annual Review of Food Science and Technology*, *11*, 93-118. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051708>
- Grzeškowiak, Ł., Endo, A., Beasley, S., & Salminen, S. (2015a). Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. *Anaerobe*, *34*, 14-23. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.002>
- Grzeškowiak, Ł., Endo, A., Beasley, S., & Salminen, S. (2015b). Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. *Anaerobe*, *34*, 14-23. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.002>
- Guardabassi, L., Schwarz, S., & Lloyd, D. H. (2004). Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria: Review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *54*(2), 321-332. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh332>
- Guerra, B., Fischer, J., & Helmuth, R. (2014). An emerging public health problem: Acquired carbapenemase-producing microorganisms are present in food-producing animals, their environment, companion animals and wild birds. *Veterinary Microbiology*, *171*(3-4), 290-297. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.001>
- Güven, A., Güven, A., & Gülmez, M. (2003). The Effect of Kefir on the Activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO Levels in Carbon Tetrachloride-Induced Mice Tissues. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, *50*(8), 412-416. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2003.00693.x>
- Guzel-Seydim, Z. B., Gökırmaklı, Ç., & Greene, A. K. (2021). A comparison of milk kefir and water kefir: Physical, chemical, microbiological and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, *113*, 42-53. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.041>
- Harada, K., Okada, E., Shimizu, T., Kataoka, Y., Sawada, T., & Takahashi, T. (2012). Antimicrobial resistance, virulence profiles, and phylogenetic groups of fecal *Escherichia coli* isolates: A comparative analysis between dogs and their owners in Japan. *Comparative Immunology*,

- Microbiology and Infectious Diseases*, 35(2), 139-144.  
<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2011.12.005>
- Harper, E. J. (1998). Changing Perspectives on Aging and Energy Requirements: Aging and Digestive Function in Humans, Dogs and Cats. *The Journal of Nutrition*, 128(12), 2632S-2635S.  
<https://doi.org/10.1093/jn/128.12.2632S>
- Hertzler, S. R., & Clancy, S. M. (2003). Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal of the American Dietetic Association*, 103(5), 582-587.  
<https://doi.org/10.1053/jada.2003.50111>
- Hugo, A. a., Kakisu, E., De Antoni, G. I., & Pérez, P. f. (2008). Lactobacilli antagonize biological effects of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in vitro. *Letters in Applied Microbiology*, 46(6), 613-619.  
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02363.x>
- Hugo, A. A., Kakisu, E., De Antoni, G. L., & Pérez, P. F. (2008). Lactobacilli antagonize biological effects of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in vitro. *Letters in Applied Microbiology*, 46(6), 613-619.  
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02363.x>
- INEN. (2011). *Leches fermentadas. Requisitos. NTE INEN 2395:2011*.  
<https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte-inen-2395-2r.pdf>
- Irigoyen, A., Arana, I., Castiella, M., Torre, P., & Ibáñez, F. C. (2005). Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. *Food Chemistry*, 90(4), 613-620.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.04.021>
- Ishida, M., Sakata, N., Ise, I., Ono, T., Shimura, M., Ishii, K., Murakami, M., Takadate, T., Aoki, T., Kudo, K., Ohnuma, S., Fukase, K., Ohtsuka, H., Mizuma, M., Hayashi, H., Nakagawa, K., Morikawa, T., Motoi, F., Naitoh, T., & Unno, M. (2018). The comparative anatomy of the folds, fossae, and adhesions around the duodenojejunal flexure in mammals. *Folia Morphologica*, 77(2), 286-292.  
<https://doi.org/10.5603/FM.a2017.0089>

- Jeong, D., Kim, D.-H., Kang, I.-B., Kim, H., Song, K.-Y., Kim, H.-S., & Seo, K.-H. (2017). Characterization and antibacterial activity of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* DN1 isolated from kefir. *Food Control*, *78*, 436-442.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.033>
- Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R. K., Duerr, R. H., McGovern, D. P., Hui, K. Y., Lee, J. C., Schumm, L. P., Sharma, Y., Anderson, C. A., Essers, J., Mitrovic, M., Ning, K., Cleynen, I., Theatre, E., Spain, S. L., Raychaudhuri, S., Goyette, P., Wei, Z., ... Cho, J. H. (2012). Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*, *491*(7422), 119-124.  
<https://doi.org/10.1038/nature11582>
- Kakisu, E., Abraham, A. G., Farinati, C. T., Ibarra, C., & De Antoni, G. L. (2013). *Lactobacillus plantarum* isolated from kefir protects vero cells from cytotoxicity by type-II shiga toxin from *Escherichia coli* O157:H7. *The Journal of Dairy Research*, *80*(1), 64-71.  
<https://doi.org/10.1017/S0022029912000659>
- Khan, F. A., Söderquist, B., & Jass, J. (2019). Prevalence and Diversity of Antibiotic Resistance Genes in Swedish Aquatic Environments Impacted by Household and Hospital Wastewater. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 688. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00688>
- Kilani, H., Ferjani, S., Mansouri, R., Boutiba-Benboubaker, I., & Abbassi, M. S. (2020). Occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants among *Escherichia coli* strains isolated from animals in Tunisia: Specific pathovars acquired qnr genes. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *20*, 50-55. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.07.023>
- Kim, D.-H., Jeong, D., Kang, I.-B., Lim, H.-W., Cho, Y., & Seo, K.-H. (2019). Modulation of the intestinal microbiota of dogs by kefir as a functional dairy product. *Journal of Dairy Science*, *102*(5), 3903-3911. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15639>

- Kim, D.-H., Jeong, D., Kim, H., Kang, I.-B., Chon, J.-W., Song, K.-Y., & Seo, K.-H. (2016). Antimicrobial Activity of Kefir against Various Food Pathogens and Spoilage Bacteria. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 36(6), 787-790. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2016.36.6.787>
- Kunhikannan, S., Thomas, C. J., Franks, A. E., Mahadevaiah, S., Kumar, S., & Petrovski, S. (2021). Environmental hotspots for antibiotic resistance genes. *MicrobiologyOpen*, 10(3), e1197. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1197>
- Kwon, O.-K., Ahn, K.-S., Lee, M.-Y., Kim, S.-Y., Park, B.-Y., Kim, M.-K., Lee, I.-Y., Oh, S.-R., & Lee, H.-K. (2008). Inhibitory effect of kefir on ovalbumin-induced lung inflammation in a murine model of asthma. *Archives of Pharmacal Research*, 31(12), 1590-1596. <https://doi.org/10.1007/s12272-001-2156-4>
- La Hora. (2021). *El abandono de perros en Quito se incrementó en 90%*. <https://www.lahora.com.ec/pais/el-abandono-de-perros-en-quito-se-incremento-en-90/>
- Laatikainen, R., Koskenpato, J., Hongisto, S.-M., Loponen, J., Poussa, T., Hillilä, M., & Korpela, R. (2016). Randomised clinical trial: Low-FODMAP rye bread vs. regular rye bread to relieve the symptoms of irritable bowel syndrome. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 44(5), 460-470. <https://doi.org/10.1111/apt.13726>
- Lanz, R., Kuhnert, P., & Boerlin, P. (2003). Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Veterinary Microbiology*, 91(1), 73-84. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(02\)00263-8](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(02)00263-8)
- Leite, A. M. O., Mayo, B., Rachid, C. T. C. C., Peixoto, R. S., Silva, J. T., Paschoalin, V. M. F., & Delgado, S. (2012). Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. *Food Microbiology*, 31(2), 215-221. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.03.011>

- Levy, S. B., & Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, 10(12 Suppl), S122-129. <https://doi.org/10.1038/nm1145>
- Leyva, S., & Leyva, E. (2008). *Fluoroquinolonas. Mecanismos de acción y resistencia, estructura, síntesis y reacciones fisicoquímicas importantes para propiedades medicinales*. <http://bsqm.org.mx/pdf-boletines/V2/N1/1.%20SocorroLeyva%5B1%5DREV.pdf>
- Loayza, M. F., Salinas, L., Villavicencio, F., Rafael, T., Salas, S., Villacís, J., Satan, C., Ushiña, L., Rivera, R., Muñoz, O., Zurita, J., Nathalie, T., Melano, R., Reyes, J., & Trueba, G. (2018). *Diverse Escherichia coli lineages, from domestic animals and humans in a household, carry colistin resistance gene mcr-1 in Ecuador* (p. 350587). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/350587>
- Lopitz-Otsoa, F., Rementeria, A., Elguezabal, N., & Garaizar, J. (2006). Kefir: A symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Revista Iberoamericana De Micología*, 23(2), 67-74. [https://doi.org/10.1016/s1130-1406\(06\)70016-x](https://doi.org/10.1016/s1130-1406(06)70016-x)
- Maeda, H., Zhu, X., Omura, K., Suzuki, S., & Kitamura, S. (2004). Effects of an exopolysaccharide (kefiran) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation. *BioFactors (Oxford, England)*, 22(1-4), 197-200. <https://doi.org/10.1002/biof.5520220141>
- Maki, R., Matsukawa, M., Matsuduka, A., Hashinaga, M., Anai, H., Yamaoka, Y., Hanada, K., & Fujii, C. (2018). Therapeutic effect of lyophilized, Kefir-fermented milk on constipation among persons with mental and physical disabilities. *Japan Journal of Nursing Science: JJNS*, 15(3), 218-225. <https://doi.org/10.1111/jjns.12189>
- Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Foligné, B., Gänzle, M., Kort, R., Pasin, G., Pihlanto, A., Smid, E. J., & Hutkins, R. (2017a). Health benefits of fermented foods: Microbiota and beyond. *Current Opinion in Biotechnology*, 44, 94-102. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.010>



- Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Foligné, B., Gänzle, M., Kort, R., Pasin, G., Pihlanto, A., Smid, E. J., & Hutkins, R. (2017b). Health benefits of fermented foods: Microbiota and beyond. *Current Opinion in Biotechnology*, *44*, 94-102.  
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.010>
- Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2017). Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*, *9*(9), 1021. <https://doi.org/10.3390/nu9091021>
- Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2018). The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathogens*, *10*, 21. <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0250-0>
- Marshall, V. M., & Cole, W. M. (1985). Methods for making kefir and fermented milks based on kefir. *Journal of Dairy Research*, *52*(3), 451-456. <https://doi.org/10.1017/S0022029900024353>
- Medrano, M., Pérez, P. F., & Abraham, A. G. (2008). Kefiran antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors. *International Journal of Food Microbiology*, *122*(1-2), 1-7.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.046>
- Medrano, M., Racedo, S. M., Rolny, I. S., Abraham, A. G., & Pérez, P. F. (2011). Oral administration of kefiran induces changes in the balance of immune cells in a murine model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(10), 5299-5304. <https://doi.org/10.1021/jf1049968>
- Mella M, S., Zemelman M, C., Bello T, H., Dominguez Y, M., Gonzalez R, G., & Zemelman Z, R. (2001). Propiedades microbiológicas, clasificación y relación estructura-actividad de cefalosporinas e importancia de las cefalosporinas de cuarta generación. *Revista chilena de infectología*, *18*(1), 7-19. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182001000100002>
- Mendoza, N., & Campos, A. (2008). *Actualidades farmacológicas. Tetraciclinas*.  
<https://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2008/un081g.pdf>

- Metras, B. N., Holle, M. J., Parker, V. J., Miller, M. J., & Swanson, K. S. (2020). Assessment of commercial companion animal kefir products for label accuracy of microbial composition and quantity. *Journal of Animal Science*, 98(9), skaa301. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa301>
- Ministerio de Salud Pública. (2019). *Plan Nacional de prevención y control de la resistencia antimicrobiana (RAM)*. [https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/10/Plan-Nacional-para-la-prevenci%C3%B3n-y-control-de-la-resistencia-antimicrobiana\\_2019\\_compressed.pdf](https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/10/Plan-Nacional-para-la-prevenci%C3%B3n-y-control-de-la-resistencia-antimicrobiana_2019_compressed.pdf)
- Mirsepasi-Lauridsen, H. C., Vallance, B. A., Krogfelt, K. A., & Petersen, A. M. (2019). Escherichia coli Pathobionts Associated with Inflammatory Bowel Disease. *Clinical Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00060-18>
- Montealegre, M. C., Roy, S., Böni, F., Hossain, M. I., Navab-Daneshmand, T., Caduff, L., Faruque, A. S. G., Islam, M. A., & Julian, T. R. (2018). Risk Factors for Detection, Survival, and Growth of Antibiotic-Resistant and Pathogenic Escherichia coli in Household Soils in Rural Bangladesh. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.01978-18>
- Mordor Intelligence. (2020). *Global Feed Vitamins Market | 2022—27 | Industry Share, Size, Growth*. <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-feed-vitamins-market-industry>
- Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic Escherichia coli. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), 142-201.
- Nishita, M., Park, S.-Y., Nishio, T., Kamizaki, K., Wang, Z., Tamada, K., Takumi, T., Hashimoto, R., Otani, H., Pazour, G. J., Hsu, V. W., & Minami, Y. (2017). Ror2 signaling regulates Golgi structure and transport through IFT20 for tumor invasiveness. *Scientific Reports*, 7(1), 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-016-0028-x>
- Normark, B. H., & Normark, S. (2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine*, 252(2), 91-106. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2002.01026.x>

- O'Mahony, D., Murphy, K. B., MacSharry, J., Boileau, T., Sunvold, G., Reinhart, G., Kiely, B., Shanahan, F., & O'Mahony, L. (2009). Portrait of a canine probiotic Bifidobacterium—From gut to gut. *Veterinary Microbiology*, *139*(1-2), 106-112. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.05.002>
- OPS. (2021). *Lanzamiento del Plan Nacional de prevención y control de la resistencia antimicrobiana (RAM) 2019-2023 de Ecuador*.  
[https://www3.paho.org/ecu/index.php?option=com\\_content&view=article&id=2303:lanzamiento-del-plan-nacional-de-prevencion-y-control-de-la-resistencia-antimicrobiana-ram-2019-2023-de-ecuador&Itemid=360](https://www3.paho.org/ecu/index.php?option=com_content&view=article&id=2303:lanzamiento-del-plan-nacional-de-prevencion-y-control-de-la-resistencia-antimicrobiana-ram-2019-2023-de-ecuador&Itemid=360)
- Ortega-Paredes, D., Haro, M., Leoro-Garzón, P., Barba, P., Loaiza, K., Mora, F., Fors, M., Vinueza-Burgos, C., & Fernández-Moreira, E. (2019). Multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from canine faeces in a public park in Quito, Ecuador. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *18*, 263-268. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.04.002>
- Özdestan, Ö., & Üren, A. (2010). Biogenic amine content of kefir: A fermented dairy product. *European Food Research and Technology*, *231*(1), 101-107. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1258-y>
- Patangia, D. V., Ryan, C. A., Dempsey, E., Stanton, C., & Ross, R. P. (2022). Vertical transfer of antibiotics and antibiotic resistant strains across the mother/baby axis. *Trends in Microbiology*, *30*(1), 47-56. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.05.006>
- Penakalapati, G., Swarthout, J., Delahoy, M. J., McAliley, L., Wodnik, B., Levy, K., & Freeman, M. C. (2017). Exposure to Animal Feces and Human Health: A Systematic Review and Proposed Research Priorities. *Environmental Science & Technology*, *51*(20), 11537-11552.  
<https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02811>
- Perilli, M., Segatore, B., Mugnaioli, C., Celenza, G., Rossolini, G. M., Stefani, S., Luzzaro, F., Pini, B., & Amicosante, G. (2011). Persistence of TEM-52/TEM-92 and SHV-12 extended-spectrum  $\beta$ -

- lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Italy. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, 17(4), 521-524. <https://doi.org/10.1089/mdr.2011.0059>
- Pessione, E., & Cirrincione, S. (2016). Bioactive Molecules Released in Food by Lactic Acid Bacteria: Encrypted Peptides and Biogenic Amines. *Frontiers in Microbiology*, 7, 876. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00876>
- Pilla, R., & Suchodolski, J. S. (2020). The Role of the Canine Gut Microbiome and Metabolome in Health and Gastrointestinal Disease. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 498. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00498>
- Procter, T. D., Pearl, D. L., Finley, R. L., Leonard, E. K., Janecko, N., Reid-Smith, R. J., Weese, J. S., Peregrine, A. S., & Sargeant, J. M. (2014). A cross-sectional study examining the prevalence and risk factors for anti-microbial-resistant generic Escherichia coli in domestic dogs that frequent dog parks in three cities in south-western Ontario, Canada. *Zoonoses and Public Health*, 61(4), 250-259. <https://doi.org/10.1111/zph.12064>
- Puvača, N., & de Llanos Frutos, R. (2021). Antimicrobial Resistance in Escherichia coli Strains Isolated from Humans and Pet Animals. *Antibiotics*, 10(1), 69. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010069>
- Redondo-Salvo, S., Fernández-López, R., Ruiz, R., Vielva, L., de Toro, M., Rocha, E. P. C., Garcillán-Barcia, M. P., & de la Cruz, F. (2020). Pathways for horizontal gene transfer in bacteria revealed by a global map of their plasmids. *Nature Communications*, 11(1), 3602. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17278-2>
- Reid, G., Gadir, A. A., & Dhir, R. (2019). Probiotics: Reiterating What They Are and What They Are Not. *Frontiers in Microbiology*, 10, 424. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00424>
- Reyes, B., Díaz, R., & Dubrovsky, J. (2015). *Folatos: Su síntesis, metabolismo, transporte y su papel en el desarrollo de plantas*. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2015/reb152b.pdf>

- Rezac, S., Kok, C. R., Heermann, M., & Hutkins, R. (2018). Fermented Foods as a Dietary Source of Live Organisms. *Frontiers in Microbiology, 9*, 1785. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01785>
- Rhys-Davies, L., & Ogden, J. (2020). Vets' and Pet Owners' Views About Antibiotics for Companion Animals and the Use of Phages as an Alternative. *Frontiers in Veterinary Science, 7*, 513770. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.513770>
- Rice, L. B., Willey, S. H., Papanicolaou, G. A., Medeiros, A. A., Eliopoulos, G. M., Moellering, R. C., & Jacoby, G. A. (1990). Outbreak of ceftazidime resistance caused by extended-spectrum beta-lactamases at a Massachusetts chronic-care facility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 34*(11), 2193-2199. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.11.2193>
- Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Hebert, R. J., Olcott, E. S., Johnson, L. M., Hargrett, N. T., Blake, P. A., & Cohen, M. L. (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli serotype. *The New England Journal of Medicine, 308*(12), 681-685. <https://doi.org/10.1056/NEJM198303243081203>
- Rípodas Navarro, A., Fernández Moreira, D., Macho Martínez, M., Rípodas Navarro, A., Fernández Moreira, D., & Macho Martínez, M. (2017). Investigación de Escherichia Coli productor de toxinas Shiga (STEC) en carnes y derivados cárnicos. *Sanidad Militar, 73*(3), 147-152. <https://doi.org/10.4321/s1887-85712017000300002>
- Rivas, K. B., Rivas, M. A., Dávila, E. L., & Rodríguez, M. (2002). Cefalosporinas: De la Primera a la Cuarta Generación. *Revista de la Facultad de Medicina, 25*(2), 142-153.
- Riveros, M., Barletta, F., Cabello, M., & Durand, D. (2011). *Patrones de adherencia de cepas de Escherichia coli difusamente adherente (DAEC) provenientes de niños con y sin diarrea.* <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v28n1/a04v28n1.pdf>

- Rodrigues, K. L., Caputo, L. R. G., Carvalho, J. C. T., Evangelista, J., & Schneedorf, J. M. (2005). Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25(5), 404-408. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.09.020>
- Rodríguez, C., & Obrador, G. (2020). *Antibióticos fluoroquinolonas, quinolonas y antisépticos urinarios I*. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1510&sectionid=98008848>
- Rodríguez, M. (2002). *Aminoglucósidos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. <https://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2002/ei021d.pdf>
- Rodríguez, R. (2017). *Penicilina V: Antimicrobianos | Vademécum Académico de Medicamentos*. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1552&sectionid=90374133>
- Romanin, D. E., Llopis, S., Genovés, S., Martorell, P., Ramón, V. D., Garrote, G. L., & Rumbo, M. (2016). Probiotic yeast *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 shows anti-inflammatory and anti-oxidative stress properties in in vivo models. *Beneficial Microbes*, 7(1), 83-93. <https://doi.org/10.3920/BM2015.0066>
- Romanin, D., Serradell, M., González Maciel, D., Lausada, N., Garrote, G. L., & Rumbo, M. (2010). Down-regulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts isolated from kefir. *International Journal of Food Microbiology*, 140(2-3), 102-108. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.014>
- Rosa, D. D., Dias, M. M. S., Grześkowiak, Ł. M., Reis, S. A., Conceição, L. L., & Peluzio, M. do C. G. (2017a). Milk kefir: Nutritional, microbiological and health benefits. *Nutrition Research Reviews*, 30(1), 82-96. <https://doi.org/10.1017/S0954422416000275>
- Rosa, D. D., Dias, M. M. S., Grześkowiak, Ł. M., Reis, S. A., Conceição, L. L., & Peluzio, M. do C. G. (2017b). Milk kefir: Nutritional, microbiological and health benefits. *Nutrition Research Reviews*, 30(1), 82-96. <https://doi.org/10.1017/S0954422416000275>

- Rosa, D. D., Dias, M. M. S., Grzeškowiak, Ł. M., Reis, S. A., Conceição, L. L., & Peluzio, M. do C. G. (2017c). Milk kefir: Nutritional, microbiological and health benefits. *Nutrition Research Reviews*, 30(1), 82-96. <https://doi.org/10.1017/S0954422416000275>
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84(3), 197-215. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(00\)00375-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(00)00375-8)
- Salazar, N., Gueimonde, M., de Los Reyes-Gavilán, C. G., & Ruas-Madiedo, P. (2016). Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria as Fermentable Substrates by the Intestinal Microbiota. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(9), 1440-1453. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.770728>
- Salinas, Z., & Jeannete, L. (2012). *Klebsiella pneumoniae productora de carbapenemasa tipo KPC-2: Primer reporte en el Ecuador*. <http://pucedspace.puce.edu.ec:80/handle/23000/579>
- Samaha-Kfoury, J. N., & Araj, G. F. (2003). Recent developments in beta lactamases and extended spectrum beta lactamases. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 327(7425), 1209-1213. <https://doi.org/10.1136/bmj.327.7425.1209>
- Santos, A., San Mauro, M., Sanchez, A., Torres, J. M., & Marquina, D. (2003). The antimicrobial properties of different strains of Lactobacillus spp. Isolated from kefir. *Systematic and Applied Microbiology*, 26(3), 434-437. <https://doi.org/10.1078/072320203322497464>
- Santos, J. P. V. (2008). *Avaliação da microbiota de grãos de kefir e atividade inibidora da bebida sobre algumas bactérias patogênicas*. <https://locus.ufv.br//handle/123456789/7734>
- Sarkar, S. (2008). Biotechnological innovations in kefir production: A review. *British Food Journal*, 110(3), 283-295. <https://doi.org/10.1108/00070700810858691>
- Sb, F., D, S., & Pi, T. (2020). The Probiotic Conundrum: Regulatory Confusion, Conflicting Studies, and Safety Concerns. *JAMA*, 323(9). <https://doi.org/10.1001/jama.2019.22268>

- Schmitz, S., & Suchodolski, J. (2016). Understanding the canine intestinal microbiota and its modification by pro-, pre- and synbiotics – what is the evidence? *Veterinary Medicine and Science*, 2(2), 71-94. <https://doi.org/10.1002/vms3.17>
- Slattery, C., Cotter, P. D., & W. O'Toole, P. (2019). Analysis of Health Benefits Conferred by Lactobacillus Species from Kefir. *Nutrients*, 11(6), 1252. <https://doi.org/10.3390/nu11061252>
- Strompfová, V., Kubašová, I., Farbáková, J., Mađari, A., Gancarčíková, S., Mudroňová, D., & Lauková, A. (2018). Evaluation of Probiotic Lactobacillus fermentum CCM 7421 Administration with Alginate in Dogs. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(3), 577-588. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9370-y>
- Strompfová, V., Lauková, A., & Gancarčíková, S. (2012). Effectivity of freeze-dried form of Lactobacillus fermentum AD1-CCM7421 in dogs. *Folia Microbiologica*, 57(4), 347-350. <https://doi.org/10.1007/s12223-012-0139-0>
- Tagliabue, A., & Rappuoli, R. (2018). Changing Priorities in Vaccinology: Antibiotic Resistance Moving to the Top. *Frontiers in Immunology*, 9, 1068. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01068>
- Teixeira, N. B., Rojas, T. C. G., da Silveira, W. D., Matheus-Guimarães, C., Silva, N. P., & Scaletsky, I. C. A. (2015). Genetic analysis of enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) adherence factor (EAF) plasmid reveals a new deletion within the EAF probe sequence among O119 typical EPEC strains. *BMC Microbiology*, 15, 200. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0539-9>
- Tellevik, M. G., Blomberg, B., Kommedal, Ø., Maselle, S. Y., Langeland, N., & Moyo, S. J. (2016). High Prevalence of Faecal Carriage of ESBL-Producing Enterobacteriaceae among Children in Dar es Salaam, Tanzania. *PLOS ONE*, 11(12), e0168024. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168024>
- Tello Valencia, G. A. (2013). *Diseño de un atlas interactivo de la anatomía del sistema digestivo del perro para ser aplicado como herramienta tecnológica en la cátedra de Anatomía*. <https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/5490>



- Turan, İ., Dedeli, Ö., Bor, S., & İltter, T. (2014). Effects of a kefir supplement on symptoms, colonic transit, and bowel satisfaction score in patients with chronic constipation: A pilot study. *The Turkish Journal of Gastroenterology: The Official Journal of Turkish Society of Gastroenterology*, 25(6), 650-656. <https://doi.org/10.5152/tjg.2014.6990>
- ur Rahman, S., Ali, T., Ali, I., Khan, N. A., Han, B., & Gao, J. (2018). The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Beta-Lactamases. *BioMed Research International*, 2018, 9519718. <https://doi.org/10.1155/2018/9519718>
- Vásconez, I., Solís, D., & Córdova, M. (2017). *Desarrollo de instructivos de Seguridad e Higiene Industrial a partir del análisis aerobiológico del Relleno Sanitario de la Empresa Pública Municipal Gestión Integral de Desechos Sólidos del Cantón Salcedo.*
- Vázquez-Baeza, Y., Hyde, E. R., Suchodolski, J. S., & Knight, R. (2016). Dog and human inflammatory bowel disease rely on overlapping yet distinct dysbiosis networks. *Nature Microbiology*, 1(12), 1-5. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.177>
- Vidal, J. E., Canizález-Román, A., Gutiérrez-Jiménez, J., & Navarro-García, F. (2007). Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de Escherichia coli enteropatógena. *Salud Pública de México*, 49(5), 376-386.
- Vinderola, G., Perdígón, G., Duarte, J., Farnworth, E., & Matar, C. (2006). Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirianofaciens* on the gut mucosal immunity. *Cytokine*, 36(5-6), 254-260. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2007.01.003>
- Wang, S. Y., Chen, H. C., Liu, J. R., Lin, Y. C., & Chen, M. J. (2008). Identification of yeasts and evaluation of their distribution in Taiwanese Kefir and Viili starters. *Journal of Dairy Science*, 91(10), 3798-3805. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0468>

- Weese, J. S., & Anderson, M. E. C. (2002). Preliminary evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG, a potential probiotic in dogs. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*, 43(10), 771-774.
- Witthuhn, R. C., Cilliers, A., & Britz, T. J. (2005). Evaluation of different preservation techniques on the storage potential of Kefir grains. *Journal of Dairy Research*, 72(1), 125-128.  
<https://doi.org/10.1017/S0022029904000652>
- Wszolek, M., Kupiec-Teahan, B., Skov Guldager, H., & Tamime, A. Y. (2006). Production of Kefir, Koumiss and other Related Products. En *Fermented Milks* (pp. 174-216). John Wiley & Sons, Ltd.  
<https://doi.org/10.1002/9780470995501.ch8>
- Yadav, M. K., Kumari, I., Singh, B., Sharma, K. K., & Tiwari, S. K. (2022). Probiotics, prebiotics and synbiotics: Safe options for next-generation therapeutics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-17. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11646-8>
- Yüksekdağ, Z. N., Beyatli, Y., & Aslim, B. (2004). Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic. *LWT - Food Science and Technology*, 37(6), 663-667. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.02.004>
- Zhang, C., Derrien, M., Levenez, F., Brazeilles, R., Ballal, S. A., Kim, J., Degivry, M.-C., Quéré, G., Garault, P., van Hylckama Vlieg, J. E. T., Garrett, W. S., Doré, J., & Veiga, P. (2016). Ecological robustness of the gut microbiota in response to ingestion of transient food-borne microbes. *The ISME Journal*, 10(9), 2235-2245. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.13>
- Zhang, P. L. C., Shen, X., Chalmers, G., Reid-Smith, R. J., Slavic, D., Dick, H., & Boerlin, P. (2018). Prevalence and mechanisms of extended-spectrum cephalosporin resistance in clinical and fecal Enterobacteriaceae isolates from dogs in Ontario, Canada. *Veterinary Microbiology*, 213, 82-88.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.11.020>

Zhao, W.-H., & Hu, Z.-Q. (2013). Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(1), 79-101.

<https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.691460>

Żółkiewicz, J., Marzec, A., Ruszczyński, M., & Feleszko, W. (2020). Postbiotics—A Step Beyond Pre- and Probiotics. *Nutrients*, 12(8), 2189. <https://doi.org/10.3390/nu12082189>

### **Capitulo VIII: Anexos**