

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

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

AUTORA: FRÍAS ZAMBRANO SUSANA MARIANELA

DIRECTOR: Rafael Eduardo Vargas Verdesoto M. Sc.

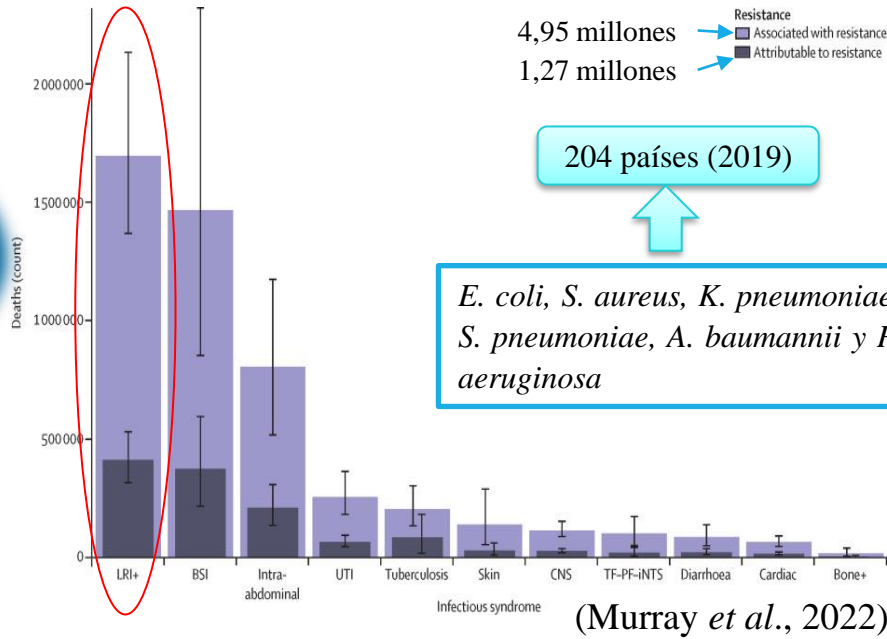
SANGOLQUÍ

2022



-  Introducción
-  Objetivos
-  Hipótesis
-  Materiales y Métodos
-  Resultados y Discusión
-  Conclusiones
-  Recomendaciones

Resistencia a los antimicrobianos (RAM)

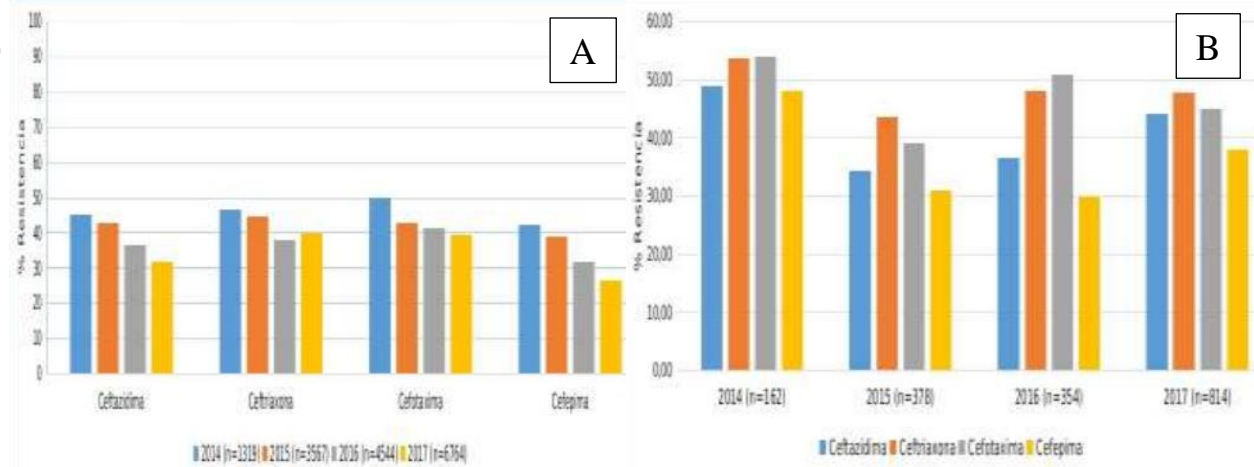
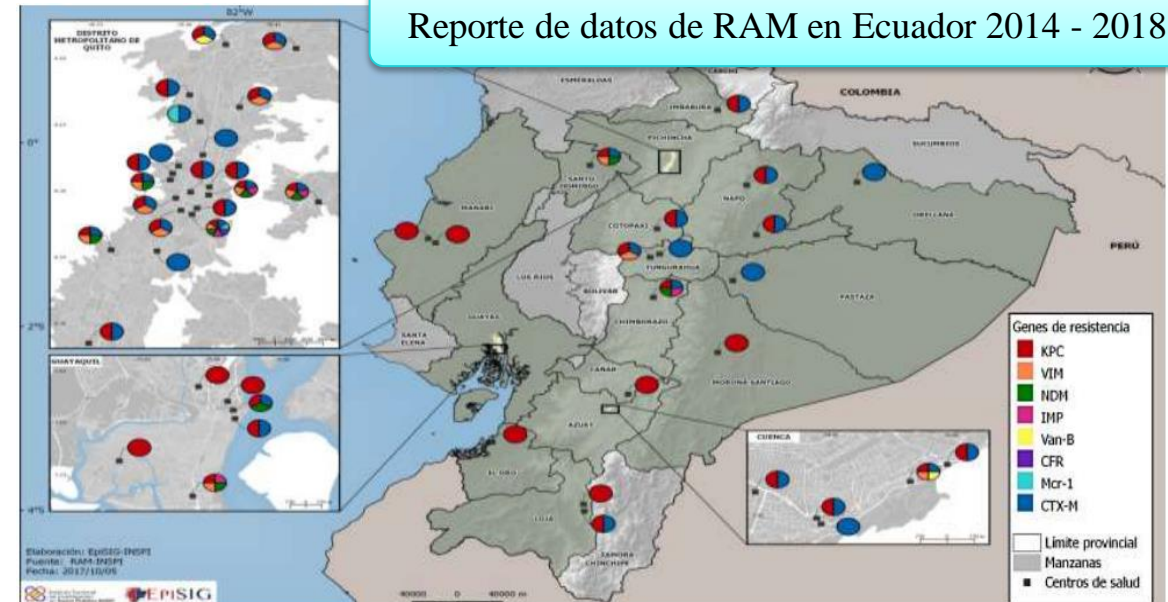


Respaldo Científico



(Moreno Switt et al., 2020)

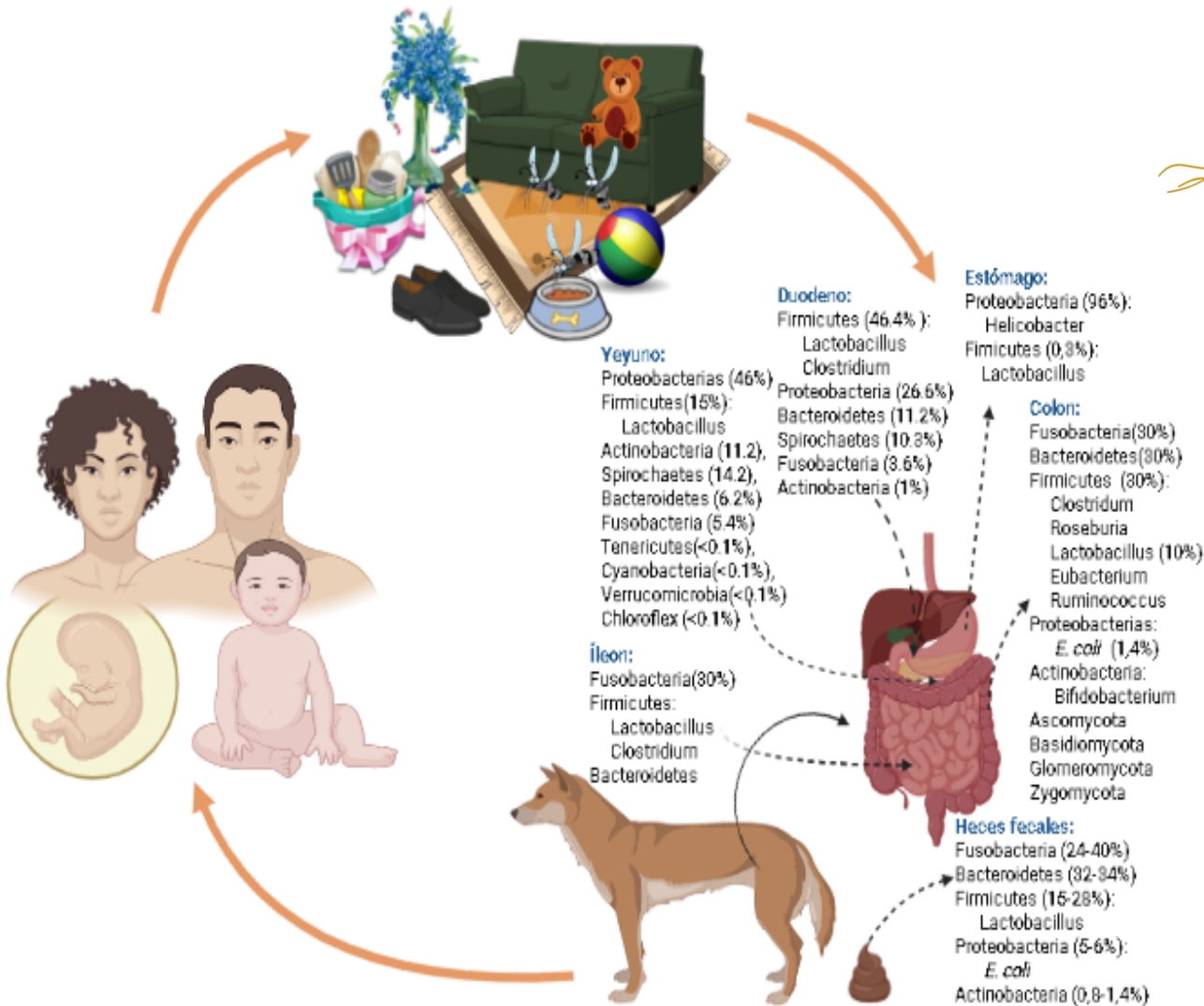
Reporte de datos de RAM en Ecuador 2014 - 2018



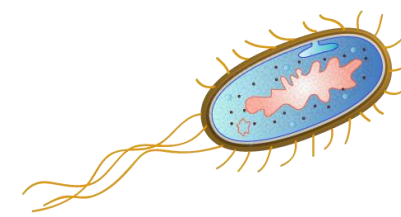
(CRN-RAM INSPI, 2019)



Interacción humano-perro-ambiente



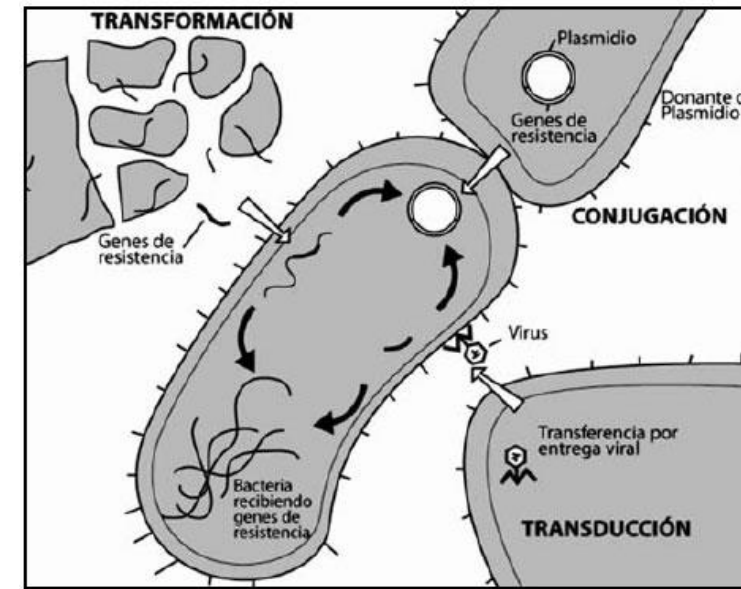
Fenotipo de resistencia de *Escherichia coli*



Microorganismo
oportunista

- Microbiota autóctona
- Infecciones gastrointestinales

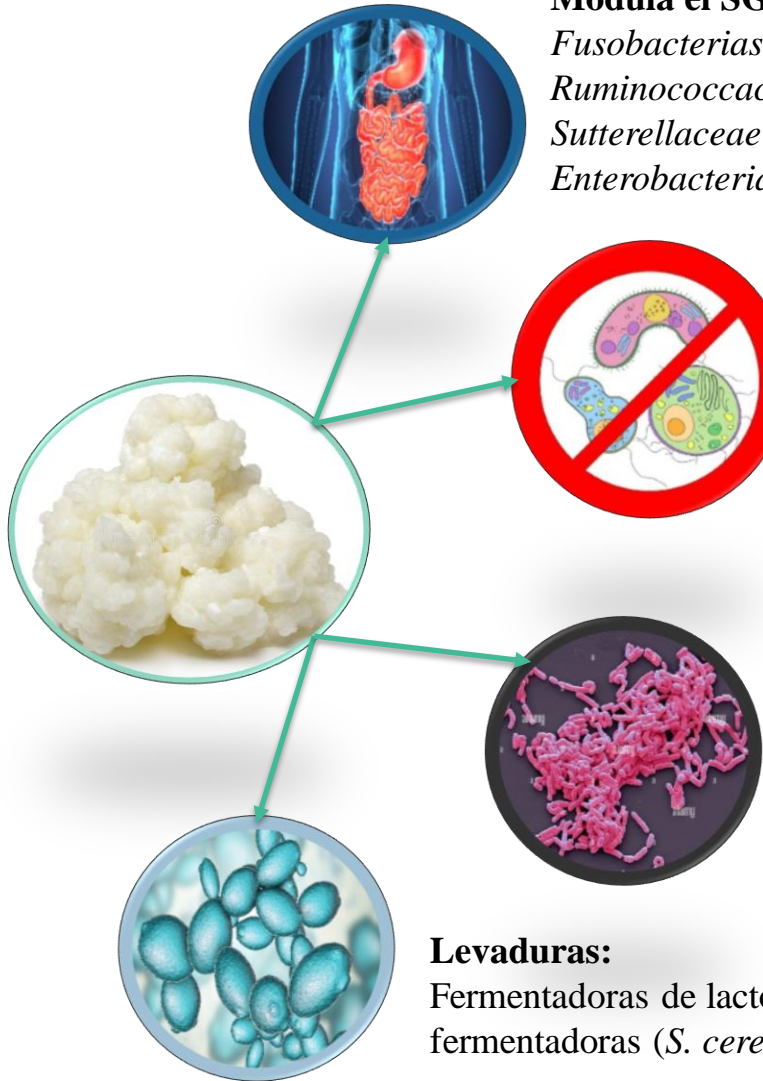
Genes de resistencia (TEM,
SHV, CTX-M)



Betalactamasas de
espectro extendido
(BLEE)

Mecanismos de
resistencia
Transferencia
horizontal de
genes (HGT)

Kéfir de leche



Modula el SGT:

Fusobacterias, Firmicutes, Ruminococcaceae, Selenomonadaceae y Sutterellaceae a excepción de *Enterobacteriaceae*

Antimicrobiano contra:

Candida albicans, Salmonella spp., *E. coli, Bacillus subtilis, Enterococcus faecalis, Staphylococcus* spp. y *Pseudomonas aeruginosa*

Bacterias:

Ácido lácticas (*L. kefir* – 80%) y ácido acéticas (*A. lovaniensis*)

Levaduras:

Fermentadoras de lactosa y no fermentadoras (*S. cerevisiae*)

Composición química	Descripción
Humedad	90%
Azúcares	6% (lactosa)
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
CO2	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
Antioxidantes	Catequina

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.

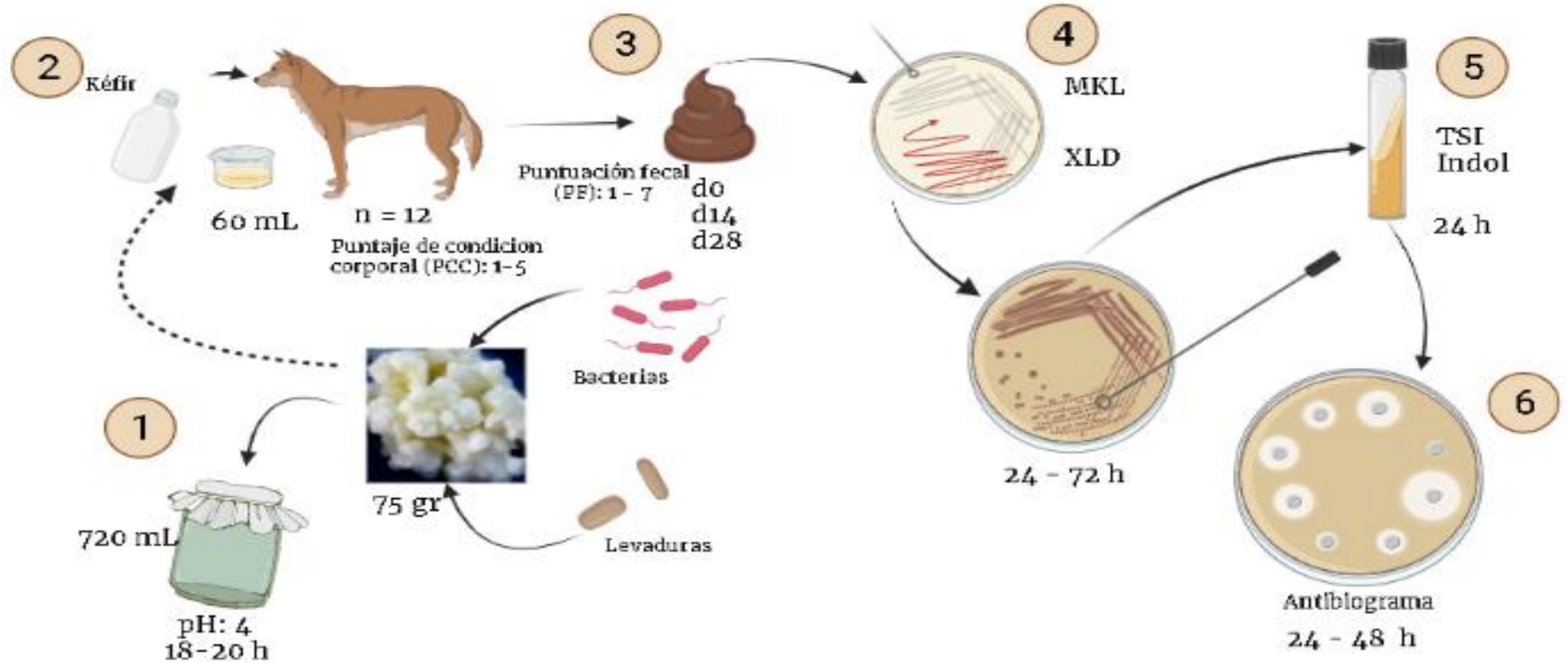


H_0 : La suplementación de kéfir de leche en la dieta de canes no influye en el fenotipo de resistencia de *Escherichia coli* aislada de heces fecales de canes en comparación con la dieta sin suplementación de kéfir de leche.

H_i : 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.



MATERIALES Y MÉTODOS



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Exámenes físicos y parámetros fecales

Tabla 1. Exámenes físicas y parámetros fecales de los perros en la investigación al día 0

Raza	Género	Edad (años)	Peso (kg)	Puntaje de condición corporal (PCC)(1-5)	Puntuación fecal (PF)(1-7)	
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.

Table 1. Physical examination and fecal parameters of dogs on d 0 and 14¹

Parameter	d 0	d 14
BW (kg)	28.65 ± 2.94 ^a	28.28 ± 2.63 ^a
BCS ^a	3 ^a	3 ^a
Fecal water contents (%)	62.51 ± 4.14 ^a	70.70 ± 1.73 ^b
Bristol score	3.5 ± 0.84 ^a	3.67 ± 0.52 ^a
Occult blood in feces	0/6	0/6

^{a,b}Different letters in a row indicate a significant difference ($P < 0.05$ by paired and 2-way Student's *t*-test). (Kim *et al.*, 2019)

Tabla 2. Exámenes físicas y parámetros fecales de los perros durante la experimentación

Parámetros	Geriátricos	Adultos
Peso (kg)	16,44 ± 1,45	17,8 ± 3,5
Puntuación de condición corporal (PCC)	3,83 ± 0,6	3 ± 0,5
Puntuación fecal (PF)		3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estadística descriptiva

Antibiogramas al día 0

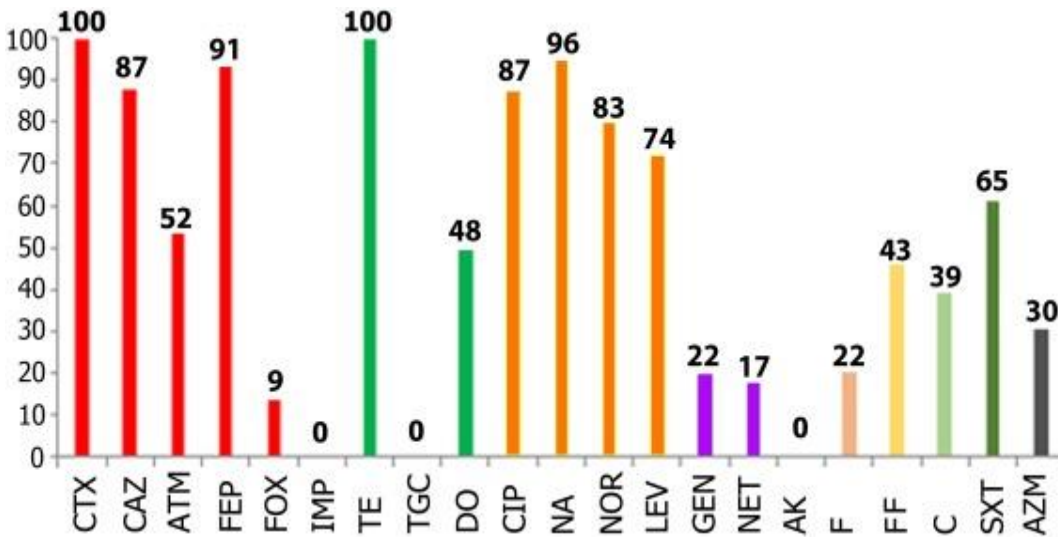
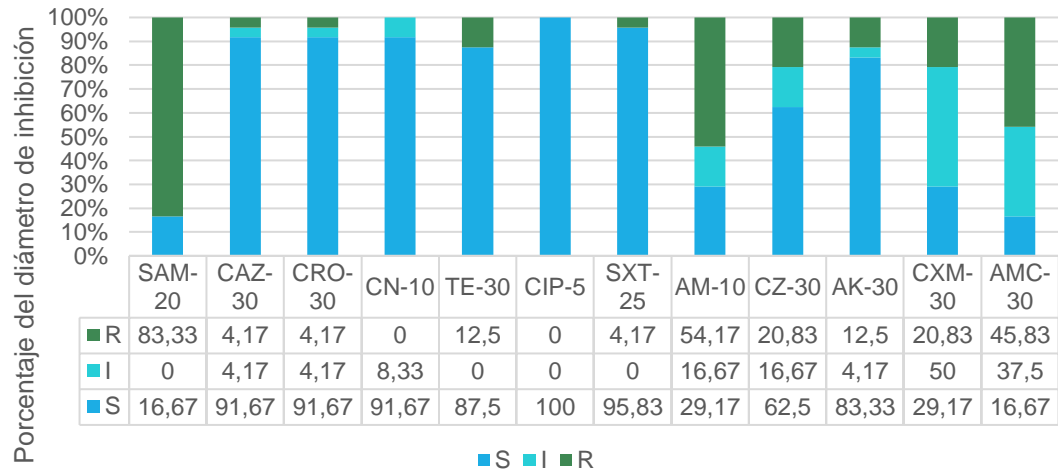
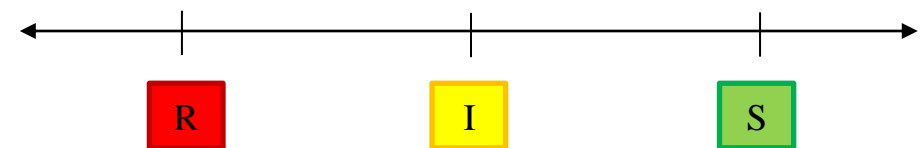


Tabla 3. Patrones de susceptibilidad por las cefalosporinas de los aislados de las heces fecales de canes

Especie bacteriana aislada	Tiempo	Antibióticos	Número de aislados resistentes	Número total de aislamientos	Nivel de resistencia (%) con IC del 95%	Patrón de susceptibilidad
<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



Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (M100-S24).

(Albán *et al.*, 2020; Tellevik *et al.*, 2016)



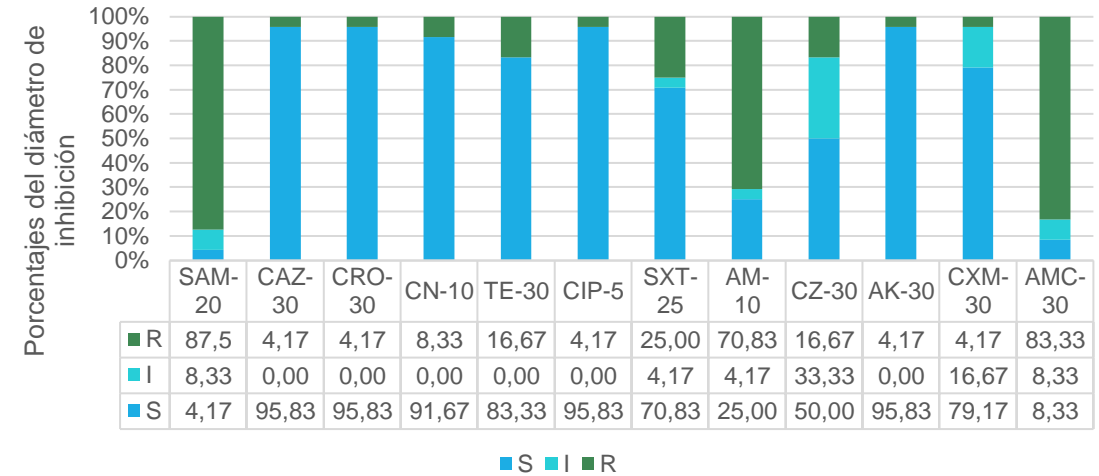
ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

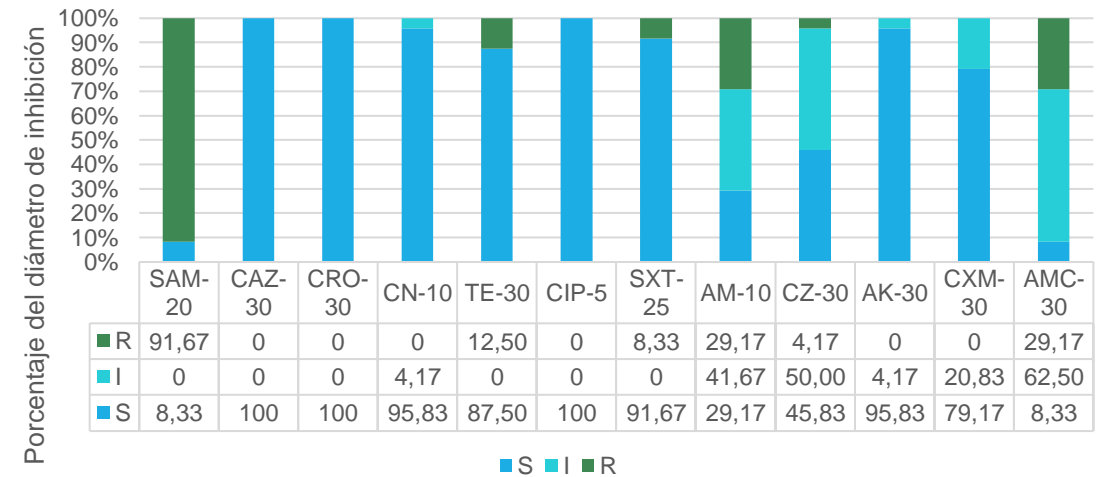
Tabla 4. Patrones de susceptibilidad de los aislados de las heces fecales de canes

Especie bacteriana aislada	Tiempo	Antibióticos	Número de aislados resistentes	Número total de aislamientos	Nivel de resistencia (%) con IC del 95%	Patrón de susceptibilidad
<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
		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
	d14	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
		CIP-5	1	24	4,17 (40,84 - 46,82)	Muy sensible
d28	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	
	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	

Antibiogramas al día 14



Antibiogramas al día 28



(Patangia et al., 2022).



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estadística inferencial

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	57,39	2	28,69	0,60	0,5522
Día	57,39	2	28,69	0,60	0,5522
Error	1566,17	33	47,46		
Total	1623,56	35			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 47,4596 gl: 33

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

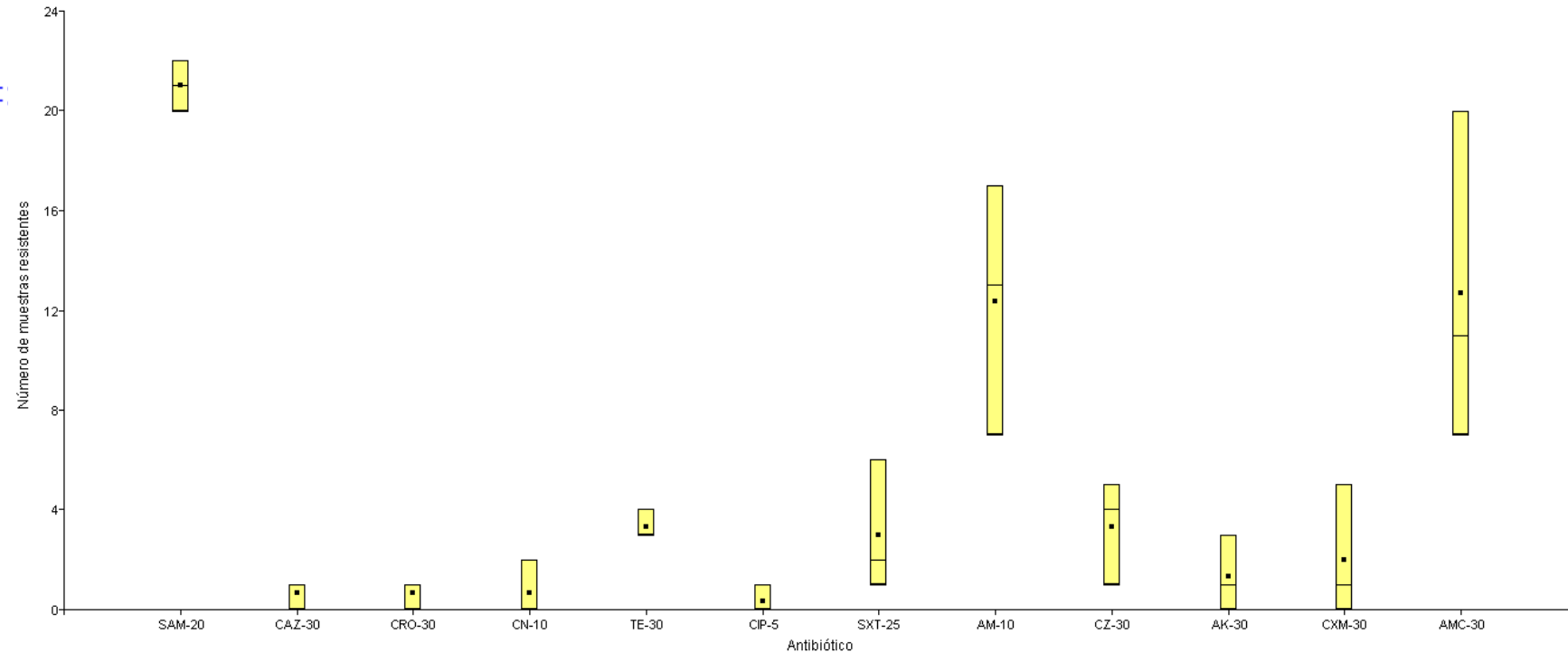
Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 7,8333 gl: 24

Antibiótico	Medias	n	E.E.	
CIP-5	0,33	3	1,62	A
CAZ-30	0,67	3	1,62	A
CN-10	0,67	3	1,62	A
CRO-30	0,67	3	1,62	A
AK-30	1,33	3	1,62	A
CXM-30	2,00	3	1,62	A
SXT-25	3,00	3	1,62	A
TE-30	3,33	3	1,62	A
CZ-30	3,33	3	1,62	A
AM-10	12,33	3	1,62	B
AMC-30	12,67	3	1,62	B
SAM-20	21,00	3	1,62	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Resistencia de los antibióticos en el periodo experimental



Modulación por Kim
et al., (2019)

Fusobacterias, Firmicutes, Ruminococcaceae, Selenomonadaceae y Sutterellaceae a excepción de Enterobacteriaceae



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.



RECOMENDACIONES

Estandarizar protocolos de administración de kéfir de leche a perros sanos para evaluar el potencial efecto sobre el equilibrio del microbiota intestinal.

Identificar y aseverar la presencia de bacterias multirresistentes mediante técnicas más robustas de metagenómica.

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.



AGRADECIMIENTOS



Colaboradores científicos

Karina Ponce M. Sc.

Directora de la Carrera de Biotecnología de las Fuerzas Armadas - ESPE

Rafael Vargas M. Sc.

Tutor de tesis

Pedro Romero Saker M. Sc.

Biometrista

Fernanda Loayza Villa Ph.D

Universidad San Francisco de Quito - USFQ

María Soledad Benitez Ponce Ph.D

Universidad Estatal de Ohio

Familia y amigos



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



Gracias



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA