

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



“Frecuencia de *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* y *Enterobacter spp.* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en perros clínicamente sanos”

Tesis para optar el Título Profesional de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Vania Andrea Mendoza Roca

Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia

Lima – Perú

2020

*A mi madre, por creer en mí y
motivarme a seguir adelante a pesar
de las dificultades. Sin ti este gran
logro no hubiera sido posible.*

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial a mi asesor de tesis, Dr. Carlos Shiva, por su compromiso, dedicación y apoyo brindado para el desarrollo del proyecto.

A mis jurados de tesis, Dr. Luis Jara y Dr. Néstor Falcón, por la orientación y conocimientos brindados para lograr este gran paso.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y la Clínica Veterinaria Docente Cayetano Heredia, por brindar las instalaciones y proveer facilidades para la ejecución del estudio.

A todas las personas que, de una u otra forma, colaboraron con la realización del presente proyecto.

RESUMEN

El incremento de la frecuencia de enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) representan una amenaza grave tanto para la práctica clínica veterinaria como para la salud pública. En este contexto, se sugiere que los perros son reservorios y potenciales transmisores de estos patógenos al humano. El objetivo de este estudio es determinar la presencia de *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* y *Enterobacter spp.* BLEE en perros sanos de la Clínica Veterinaria Docente Cayetano Heredia (San Martín de Porres, Lima). Muestras fecales de perros sanos (n=58) fueron sembradas en agar de cultivo cromogénico HiCrome™ ESBL. Las cepas aisladas fueron sometidas a pruebas bioquímicas y sembradas en agar McConkey. Posteriormente, la confirmación de cepas productoras de BLEE se realizó mediante la técnica de sinergia de doble disco (DDST) descrita por “El Comité Europeo sobre las Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana” (EUCAST). La frecuencia de *E. coli* y *Klebsiella spp.* productoras de BLEE fue de 44.83% (n=26/58) y 6.89% (n=4/58), respectivamente; sin embargo, se descartó la presencia de *Enterobacter spp.* Adicionalmente, se halló asociación estadísticamente significativa entre las hembras y el estado de portador de *E. coli* y *Klebsiella spp.* productoras de BLEE (p=0.02).

Palabras claves: *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, BLEE

ABSTRACT

The increase in the frequency of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases (ESBL) represents a serious threat to both veterinary clinical practice and public health. In this context, it is suggested that dogs are reservoirs and potential transmitters of these pathogens to humans. The objective of this study is to determine the presence of ESBL-producing *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* and *Enterobacter spp.* in healthy dogs of the Cayetano Heredia Veterinary Teaching Clinic (San Martín de Porres, Lima). Faecal samples from healthy dogs (n=58) were seeded in HiCrome™ ESBL agar base. The isolated strains were subjected to biochemical tests and seeded on McConkey agar. Subsequently, confirmation of ESBL-producing strains was carried out using the Double Disc Synergy test (DDST) described by "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing" (EUCAST). The frequency of ESBL-producing *E. coli* and *Klebsiella spp.* was 44.83% (n=26/58) and 6.89% (n=4/58), respectively; however, presence of *Enterobacter spp.* was discarded. In addition, a statistically significant association was found between females and the carrier status of ESBL-producing *E. coli* and *Klebsiella spp.* (p=0.02).

Key words: Escherichia coli, Klebsiella spp., Enterobacter spp., ESBL

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, debido al uso irracional y extensivo de los antibióticos, se ha detectado un incremento alarmante de la resistencia bacteriana (Theuretzbacher, 2013); siendo las principales consecuencias el aumento de la morbilidad y mortalidad (Razaghi *et al.*, 2012). En este aspecto; Asia, América Latina y África son los continentes o regiones con mayor incidencia (Theuretzbacher, 2013). Asimismo, se estima que alrededor de 700 mil muertes de seres humanos a nivel mundial fueron atribuibles a infecciones por patógenos resistentes y que para el 2050 éstas ascenderían a 10 millones (Allcock *et al.*, 2017).

La resistencia bacteriana adquirida puede generarse a partir de la mutación del ADN cromosomal o la transferencia genética horizontal (Silva *et al.*, 2013). Asimismo; de acuerdo con el mecanismo de acción; se clasifica en modificación enzimática o inactivación de agentes antibacterianos, reducida acumulación intracelular de agentes antibacterianos y alteración de los sitios blanco de los agentes antibacterianos (Schwarz y Noble, 1999; Schwarz *et al.*, 2006). Si bien el fenómeno ha sido identificado en diversos grupos taxonómicos, las bacterias del género *Enterobacteriaceae* constituyen uno de los microorganismos de mayor prioridad debido a su efecto sobre múltiples fármacos de importancia crítica en medicina humana (Riedel *et al.*, 2019; Chattopadhyay, 2020). En cuanto a los mecanismos de resistencia adquiridos en este grupo heterogéneo, están involucrados la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), β -lactamasas plasmídicas tipo AmpC y carbapenemasas (Sampaio y Gales, 2016), siendo el primero uno de los más frecuentes a nivel global y de mayor impacto debido a su creciente asociación con infecciones de adquisición comunitaria y nosocomial (WHO, 2014; Dorado-García *et al.*, 2018; Nuangmek *et al.*, 2018).

Las BLEE son enzimas mayormente codificadas en plásmidos y transferibles (de cepa a cepa o entre especies bacterianas), las cuales generan la hidrólisis del anillo betalactámico de

penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación y aztreonam (García-Tello *et al.*, 2014; Rupp y Fey, 2003) y son inhibidas por ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (García *et al.*, 2010). En adición, los microorganismos productores de BLEE presentan resistencia a antibióticos no betalactámicos; tales como tetraciclinas, fluorquinolonas, aminoglucósidos o cotrimoxazol (García-Tello *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2017). De acuerdo con la estructura de aminoácidos, las BLEE se clasifican en 9 familias (TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES y OXA), las cuales en conjunto comprenden más de 300 variantes (Domingos *et al.*, 2010). Cabe mencionar que CTX-M ha cobrado significativa importancia en los últimos años debido a su rápida diseminación, llegando a posicionarse como la más prevalente en humanos y animales de compañía (García *et al.*, 2010; García-Tello *et al.*, 2014; Aslantaş y Yilmaz, 2017).

Las enterobacterias son un grupo de bacilos gram negativos caracterizados por ser inmóviles o móviles con flagelos peritricos, anaerobios facultativos y no formadores de esporas (Perez *et al.*, 2014). En cuanto a sus características bioquímicas generales, pueden crecer fácilmente en medios ordinarios; asimismo, son fermentadores de glucosa (siendo ácido y gas o solo ácido los productos generados), reductores de nitrito a nitrato, catalasa positivo y oxidasa negativo (Kumar, 2012; Parija, 2012). Por otro lado, este grupo heterogéneo es ubicuo en el suelo, agua, vegetación y tracto gastrointestinal de animales y humanos; sin embargo, algunas especies o subespecies presentan potencial patogénico (Parija, 2012). En este aspecto, *E. coli*, *Klebsiella spp.* y *Enterobacter spp.* han sido ampliamente estudiadas debido a la asociación de éstas con infecciones en heridas cutáneas, mastitis, artritis sépticas, neumonía, infecciones intraabdominales e infecciones del tracto urinario (Ewers *et al.*, 2014; Rubin y Pitout, 2014; Tuerena *et al.*, 2016).

Enterobacterias (principalmente *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* y *Enterobacter spp.*) productoras de BLEE han sido reportadas en un amplio rango de hospederos, tales como animales de compañía sanos (Ewers *et al.*, 2011; Hordijk *et al.*, 2013; Pomba *et al.*, 2017). En

este contexto, se ha indicado que la microbiota intestinal de los perros puede constituir un reservorio de genes de resistencia; los cuales, en adición, son potencialmente transmisibles al humano (Sharif *et al.*, 2017b). Se han aislado cepas de *E. coli* de origen canino con similares o idénticas características moleculares (genotipo de virulencia, características de la resistencia, contenido plasmídico y perfiles de PFGE) a las de origen humano (Albrechtova *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2016; Ljungquist *et al.*, 2016); tales como *E. coli* del clon pandémico ST131 (Albrechtova *et al.*, 2012; Aslantaş y Yilmaz, 2017). Estos hallazgos sugieren que el contacto con heces de perros es uno de los mecanismos de transmisión de BLEE al humano (Schaufler *et al.*, 2015; Pomba *et al.*, 2017; Derakhshandeh *et al.*, 2018). Por ello, resulta fundamental la identificación de estos microorganismos y del mecanismo de resistencia en nuestro medio.

Con respecto a la vigilancia epidemiológica; se han implementado métodos fenotípicos (disco combinado, sinergia de doble disco, difusión en gradiente y microdilución en caldo), moleculares (PCR y secuencia de genomas y MALDI-Tof) y automatizados (sistemas Vitek, BD Phoenix y Microscan Walkaway) para la confirmación de BLEE en muestras biológicas. (Sullivan *et al.*, 2015; EUCAST, 2017). El principio de estas técnicas se basa en el efecto sinérgico entre las oximino-cefalosporinas y el ácido clavulánico; sin embargo, se han evidenciado variaciones en cuanto al costo, tiempo de procesamiento requerido, precisión diagnóstica y reproductividad (Pereckaite *et al.*, 2018). Cabe mencionar que la prueba de sinergia de doble disco (DDST, del inglés “Double Disc Synergy Test”) es uno de los métodos más difundidos debido a su bajo costo, fácil aplicación, confiabilidad y alta especificidad (con cifras reportadas de hasta el 100%) (Pereckaite *et al.*, 2018; Teklu *et al.*, 2019).

Estudios recientes sobre la presencia de *E. coli*, *Klebsiella spp.* y *Enterobacter spp.* productoras de BLEE en perros clínicamente sanos son escasos. Con relación a *E. coli*; la menor y mayor prevalencia del estado portador es de 3.6% (Brasil) y 22.4% (Rumania), respectivamente (Domingos, 2010; Cozma *et al.*, 2015). Por otro lado, la prevalencia en cuanto a *K. pneumoniae* y *E. cloacae* es de 3.4% (Rumania) y 3.6%, (Brasil), respectivamente (Cozma *et al.*, 2015; Melo

et al., 2018). Con respecto a Perú, un estudio similar fue realizado en Lambayeque (Aguilar-Gamboa *et al.*, 2016). Si bien no se realizó la clasificación taxonómica, se halló una prevalencia general de enterobacterias productoras de BLEE del 44.4 % (Aguilar-Gamboa *et al.*, 2016). Asimismo, se requiere de un estudio piloto en Lima, Perú. De igual manera, se ha evaluado la producción de BLEE en perros enfermos, siendo 1.7% (República Checa, Francia, Alemania, Hungría, Italia, Países Bajos, Polonia, España, Suiza y Reino Unido) y 28.1% (Suiza) la menor y mayor prevalencia general reportada, respectivamente (Bogaerts *et al.*, 2015; Zogg *et al.*, 2018). En cuanto a *E. coli*; la menor y mayor prevalencia hallada fue 1.5% (República Checa, Francia, Alemania, Hungría, Italia, Países Bajos, Polonia, España, Suiza y Reino Unido) y 54.5% (China), respectivamente (Sun *et al.*, 2010; Bogaerts *et al.*, 2015). En contraste, los valores con respecto a *Klebsiella pneumoniae* oscilan entre el 0.2% (República Checa, Francia, Alemania, Hungría, Italia, Países Bajos, Polonia, España, Suiza y Reino Unido) y 7% (Alemania y 15 países europeos no mencionados) (Ewers *et al.*, 2014; Bogaerts *et al.*, 2015). Cabe mencionar que no se ha reportado la presencia de *Enterobacter spp.*

En la última década, las estrategias para el control de microorganismos multirresistentes con potencial zoonótico se han enfocado en el área de producción animal, siendo la principal consecuencia en el ámbito clínico la falta de regulación de la prescripción antibiótica (Maeyama *et al.*, 2018). En este contexto, el uso de antibióticos comunes en medicina humana en centros veterinarios ha impulsado la selección de BLEE (Tamang *et al.*, 2012; Mohammad Sharif *et al.*, 2017). Considerando el potencial rol que cumplen los perros en la transmisión de microorganismos (influenciado por la convivencia estrecha entre estas poblaciones), el monitoreo de estos animales resulta crucial en los programas de vigilancia epidemiológica (So *et al.*, 2012; Tamang *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2017).

La producción científica asociada a *E. coli*, *Klebsiella spp.* y *Enterobacter spp.* productoras de BLEE en perros clínicamente sanos se ha incrementado en los últimos años; sin embargo, se requiere de más estudios en Perú. El objetivo general de este estudio es detectar la presencia de

cepas de *E. coli*, *Klebsiella spp.* y *Enterobacter spp.* productoras de BLEE en muestras fecales de perros clínicamente sanos de la Clínica Veterinaria Docente Cayetano Heredia (San Martín de Porres, Lima). Cabe señalar que los resultados obtenidos pueden proporcionar una base para la terapia antibiótica empírica con menor riesgo de fracaso y seguimiento futuro de las tendencias de resistencia bacteriana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar y Tipo de Estudio

Se realizó un estudio de observación para identificar la presencia de cepas de *E. coli*, *Klebsiella spp.* y *Enterobacter spp.* productoras de BLEE en perros clínicamente sanos de la Clínica Veterinaria Docente Cayetano Heredia. El área de estudio está ubicada en el distrito de San Martín de Porres (departamento de Lima, Perú).

Población Objetivo y Tamaño de Muestra

La población objetivo fueron perros de cualquier raza, sexo y edad, aparentemente sanos (aquellos que acudieron para vacunación, desparasitación o control de alteraciones no asociadas a agentes microbiológicos; siendo ojo seco, cataratas, úlcera corneal por traumatismo o alteraciones anatómicas y fracturas los diagnósticos indicados en este último grupo) y sin historial de tratamiento antibiótico en el último mes.

El tamaño de muestra fue determinado a partir de la fórmula de prevalencia límite o determinación de una enfermedad. Para ello se trabajó con un nivel de confianza del 95% y una prevalencia mínima de detección de 5% (valor definido por el equipo de investigación). Se halló una muestra de 58 animales.

Recolección de Muestras

Durante el periodo de febrero a mayo del 2019 muestras fecales fueron obtenidas mediante la técnica de hisopado rectal. Se introdujo un hisopo estéril hasta traspasar el esfínter anal y se realizaron movimientos suaves de rotación para hacer la toma de las criptas anales (García *et*

al., 1993). Los hisopos fueron colocados en el medio de transporte AMIES para su posterior traslado al Laboratorio de Nutrición Animal e Inocuidad Alimentaria de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (Universidad Peruana Cayetano Heredia) (Bou *et al.*, 2015; Melo *et al.*, 2018).

Aislamiento bacteriano

El procesamiento de las muestras se realizó dentro de las primeras 4 horas de realizada la toma de muestra, siendo el primer procedimiento realizado la preparación de suspensiones (HiMedia, 2013; Melo *et al.*, 2018). Para ello cada hisopo conteniendo las muestras fue sumergido en 1 ml de cloruro de sodio al 0.9%, agitado y rotado varias veces para liberar los microorganismos (Pournaras *et al.*, 2013).

Para la identificación presuntiva de enterobacterias productoras de BLEE, las suspensiones obtenidas fueron cultivadas mediante el método de estría cruzada en el agar cromogénico HiCrome™ ESBL (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, India). Este medio, a partir de la incorporación de un suplemento de antibióticos betalactámicos y un triazol de primera generación, proporcionó selectividad para el mecanismo de resistencia en estudio e inhibió el crecimiento de microorganismos contaminantes (HiMedia, 2012; HiMedia, 2013). Las placas fueron incubadas a temperatura en un rango de 35 a 37°C y la lectura se realizó a las 24 horas de incubación (HiMedia, 2013). Las colonias rosadas a moradas fueron características de *E. coli*; mientras que las verdes azuladas se asociaron a *Klebsiella spp.* y *Enterobacter spp.* (HiMedia, 2013). Posteriormente, se seleccionaron un máximo de cinco colonias de cada grupo y, con la finalidad de obtener aislados purificados, se realizó la resiembra de éstas. Complementariamente, la caracterización de las enterobacterias aisladas se realizó a partir del cultivo en agar MacConkey; así como las pruebas de citrato, sulfuro de hidrógeno, indol, motilidad, producción de gas, ureasa y ornitina (únicamente utilizada para la diferenciación de *Klebsiella spp.* y *Enterobacter spp.*) (Procop *et al.*, 2017).

Antibiograma

Se realizó el análisis de susceptibilidad antimicrobiana en agar Mueller-Hinton (OXOID Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) siguiendo las pautas establecidas por “El Comité Europeo sobre las Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana” (EUCAST) (Domingos, 2010; EUCAST, 2017; Sharif *et al.*, 2017a). Para ello, previamente se prepararon suspensiones a partir de los inóculos bacterianos (con un tiempo de incubación no mayor a 24 horas) y cloruro de sodio al 0.9 %, las cuales fueron estandarizadas a una turbidez equivalente a 0.5 de la escala de McFarland mediante el uso de un espectofotómetro (Cortez, 2017). Se realizó el método de sinergia de doble disco, siendo utilizados discos de cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefepima (30 µg) y amoxicilina más ácido clavulánico (20/10 µg) (EUCAST, 2017). Este último fue colocado a 20 mm de los discos de cefalosporinas para facilitar la detección de la imagen sinérgica (SFM, 2019). La ampliación de la zona de inhibición alrededor de las cefalosporinas o la formación de un “ojo de cerradura” en dirección al disco de amoxicilina más ácido clavulánico confirmó la presencia de BLEE (SFM, 2019). *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 y *E. coli* ATCC 25922 fueron usados como control positivo y negativo, respectivamente; asimismo, la lectura de las placas se realizó transcurridas 16 a 24 horas de incubación (a 35±1°C) (Makarewicz *et al.*, 2015; Cortez, 2017; EUCAST, 2019).

Análisis Estadístico

Los resultados fueron resumidos mediante estadística descriptiva para variables discretas (proporciones). Se consideraron como variables de estudio la raza (definida e indefinida), el sexo, el grupo etáreo (cachorro o de 0 a 1 año de edad, adulto o mayores de 1 año a 6 años de edad, geronte o a partir de los 7 años de edad) y el historial de antibioticoterapia (reciente o en tratamiento hasta hace un año, no reciente o en tratamiento hace más de un año y nunca); siendo la asociación de las mismas evaluada mediante la prueba de Chi-cuadrado de Pearson (χ^2). Se

estableció un nivel de significancia del 5% y el paquete de software estadístico utilizado fue “STATA 13.0”.

Consideraciones Éticas

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética para el Uso de Animales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) (código de aprobación 103417). Asimismo, la autorización para el muestreo de los canes y procesamiento fue documentada mediante un formato de consentimiento informado, el cual fue previamente revisado y autorizado por el Comité de Ética para el Uso de Animales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).

RESULTADOS

De los perros muestreados (n=58), el 56.90% (n=33/58) fueron hembras y el 43.10% (n=25/58) machos; siendo 4.47 la media de edad (mediana=4, moda=7, desviación estándar=3.56, valor mínimo=0.01, valor máximo=12) (Cuadro 1). Asimismo, estuvieron involucrados con mayor frecuencia canes mestizos (51.72%, n=30/58), seguido de razas puras de tamaño pequeño a mediano (44.83%, n=26/58) y de tamaño grande (3.45%, n=2/58) (Cuadro 1). Se determinó que el 51.72% (n=30/58) de los animales en estudio habían recibido recientemente tratamiento antibiótico, mientras que el 20.69% (n=12/58) y el 27.59% (n=16/58) no recientemente y nunca, respectivamente (Cuadro 1).

Se identificó crecimiento bacteriano en el 46.55% (n=27/58) de los individuos en el agar HiCrome™ ESBL; no obstante, mediante la prueba de sinergia de doble disco (Figura 1), se confirmó la presencia de enterobacterias productoras de BLEE en el 44.83% (n=26/58) (Cuadro 1). Por otro lado, se identificaron en total 136 cepas resistentes; de las cuales el 88.24% correspondieron a *E. coli* (120/136) y el 11.76% a *Klebsiella spp.* (16/136). Cabe mencionar que se descartó la presencia de perros portadores de *Enterobacter spp.*. Por consiguiente; la frecuencia de *E. coli* y *Klebsiella spp.* fue de 44.83% (n=26/58) y 6.89% (n=4/58), respectivamente, mientras que de la infección mixta fue de 6.89% (n=4/58).

En cuando a la evaluación de las variables de estudio, se halló asociación estadísticamente significativa entre la colonización fecal por *E. coli* y *Klebsiella spp.* productoras de BLEE y el sexo, determinándose únicamente en las hembras (p=0.02) (Cuadro 2). No se identificaron diferencias estadísticamente significativas en las otras variables exploradas (raza, grupo étnico e historial de antibioticoterapia) (Cuadro 2).

CUADRO 1. Frecuencia de *E. coli* y *Klebsiella spp.* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en perros clínicamente sanos (n=58) (febrero-mayo, 2019)

Variable		Perros muestreados % (n)	Frecuencia % (n) ¹
Raza	Definida	48.28 (28)	42.86 (12)
	Indefinida	51.72 (30)	46.67 (14)
Sexo	Hembra	56.90 (33)	57.58 (19)
	Macho	43.10 (25)	28 (7)
Grupo etáreo	Cachorro	24.14 (14)	42.86 (6)
	Adulto	44.83 (26)	50 (13)
	Geronte	31.03 (18)	38.89 (7)
Historial de antibioticoterapia	Reciente	51.72 (30)	60 (18)
	No reciente	20.69 (12)	33.33 (4)
	Nunca	27.59 (16)	25 (4)
Total		100 (58)	44.83 (26)

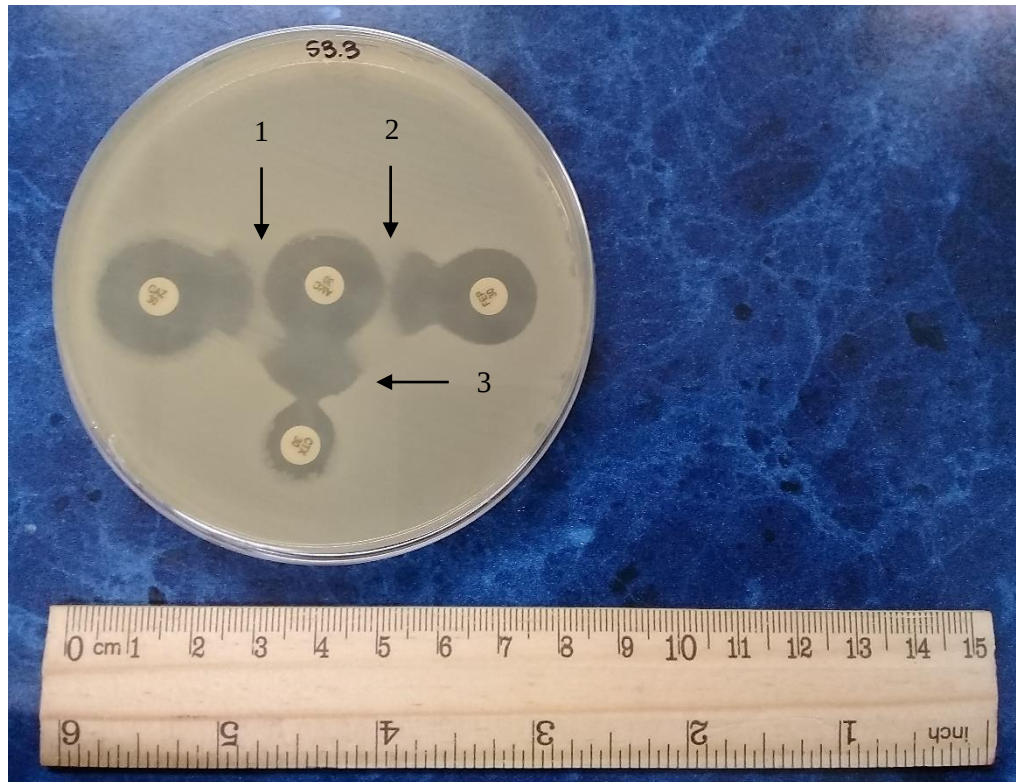
¹ Individuos identificados como portadores de *E. coli* y *Klebsiella spp.* productoras de BLEE por el antibiograma.

CUADRO 2. Asociación entre el estado de portador de *E. coli* y *Klebsiella spp.* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y variables predictoras

Variable		Muestras positivas (n), n=26	Muestras negativas (n), n=32	Significación (valor de p) ⁽¹⁾
Raza	Definida	12	16	0.7707
	Indefinida	14	16	
Sexo	Hembra	19	14	0.0249
	Macho	7	18	
Grupo etáreo	Cachorro	6	8	0.7578
	Adulto	13	13	
	Geronte	7	11	
Historial de antibioticoterapia	Reciente	18	12	0.1497
	No reciente	4	8	
	Nunca	4	12	

(1) Resultados con un valor de p de ≤ 0.05 se consideraron como variables significativamente asociadas.

FIGURA 1. Detección de *E. coli* y *Klebsiella spp.* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) mediante el método de Sinergia de Doble Disco (DDST)



- (1) Efecto sinérgico positivo ("ojo de cerradura" o distorsión de los halos de inhibición) entre el disco de ceftazidima (CAZ) y el disco central de amoxicilina más ácido clavulánico (AMC).
- (2) Efecto sinérgico positivo entre el disco de cefepima (FEP) y el disco central de amoxicilina más ácido clavulánico (AMC).
- (3) Efecto sinérgico positivo entre el disco de cefotaxima (CTX) y el disco central de amoxicilina más ácido clavulánico (AMC).

DISCUSIÓN

El presente estudio evidencia la presencia de enterobacterias productoras de BLEE en canes sin presunta enfermedad digestiva o sistémica de la Clínica Veterinaria Docente Cayetano Heredia (San Martín de Porres, Lima). Se reportó una alta frecuencia general (44.83%), siendo esta cifra similar a la hallada previamente en el país (44.4%) en un estudio observacional de corte transversal (Chiclayo, Lambayeque, Perú) (Aguilar-Gamboa *et al.*, 2016) pero considerablemente mayor que las máximas prevalencias reportadas en otros países de América Latina (11.90%), Europa (25.86%), Asia (19.79%) y África (21.76%) (Albrechtova *et al.*, 2012; Cozma *et al.*, 2015; Gumus *et al.*, 2017; Melo *et al.*, 2018). De igual modo, representando una frecuencia del 44.83%, *E. coli* fue el microorganismo preponderante. Si bien se han reportado cifras significativamente menores en Reino Unido (0.55% y 1.37%), México (5.66%), Brasil (8.33%), Túnez (12.20%), Portugal (13.20%), Argelia (14.71%) y Turquía (16.82% y 19.79%) (Domingos, 2010; Wedley *et al.*, 2011; Sallem *et al.*, 2013; Belas *et al.*, 2015; Rocha-Gracia *et al.*, 2015; Schmidt *et al.*, 2015; Yousfi *et al.*, 2016; Aslantaş y Yilmaz, 2017; Gumus *et al.*, 2017); en Kenia (21.76%) y Rumania (22.41%) se hallaron valores más cercanos al del presente estudio (Albrechtova *et al.*, 2012; Cozma *et al.*, 2015). Por otro lado, la proporción de perros portadores de *Klebsiella spp.* (6.89%) fue mayor que la documentada en Rumania con relación a *Klebsiella pneumoniae* (3.45%) (Cozma *et al.*, 2015). Asimismo, se descartó la presencia de *Enterobacter spp.*, habiéndose reportado únicamente en Brasil (3.57%) (Domingos, 2010). Se sugiere que estas variaciones geográficas no sólo se deban a la diferencia cronológica entre la toma de muestras, sino también a las características de las poblaciones evaluadas, las cuales fueron evaluadas en el presente estudio.

Aunque se descartó la asociación entre la colonización fecal por *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.* productoras de BLEE y las variables raza y grupo étnico, a nivel global se han identificado ciertas condiciones de exposición ambiental como factores de riesgo. En primer lugar, los perros

provenientes de refugios y criaderos presentan mayor riesgo de adquirir *E. coli* productoras de BLEE y β -lactamas plasmídicas de tipo AmpC (pAmpC); lo cual se ha relacionado al uso irracional de antibióticos en estos centros, en concomitancia con la convivencia en espacios comunes (Rota *et al.*, 2012; Belas *et al.*, 2014). De igual manera, se ha evaluado la implicación de los espacios públicos; hallándose cepas de *E. coli* multirresistentes en el 1.9% (n=4/209), 14% (n=14/100) y 40% (n=20/50) de muestras fecales recolectadas en Dinamarca, Alemania y Ecuador, respectivamente (Damborg *et al.*, 2015; Schaufler *et al.*, 2015; Ortega-Paredes *et al.*, 2019). Si bien se ha considerado a la interacción con perros vagabundos como una de las principales rutas de transmisión, recientemente se ha descrito la intervención de las suelas de los zapatos de visitantes de parques caninos como vectores no biológicos (Ahmed *et al.*, 2015; Melo *et al.*, 2018). Estos hallazgos sustentan la importancia de concientizar a la población en cuanto a la resistencia bacteriana, así como de implementar ordenanzas municipales con relación al recojo de deposiciones de mascotas y programas de control de la población canina en situación de calle.

En cuanto al sexo de los canes, se determinó relación estadísticamente significativa entre las hembras ($p=0.02$) y el estado de portador de *E. coli* y *Klebsiella spp.* productoras de BLEE; resultado que difiere con los hallados en Turquía, en donde no se identificaron diferencias estadísticamente significativas (Gumus *et al.*, 2017). Esta variación podría estar influenciada por una alta ocurrencia de patologías como piometra e infecciones del tracto urinario bajo en Lima Metropolitana. El factor causal ha sido establecido en seres humanos (Friedmann *et al.*, 2009; Ljungquist *et al.*, 2019); sin embargo, debido a que la información proporcionada por algunos propietarios con relación a las enfermedades previas de los canes fue imprecisa, se requerirán de estudios clínicos prospectivos para sustentar dicha hipótesis.

Otro aspecto por evaluar es el uso de antibióticos en cada población. Estudios recientes han asociado el uso de enrofloxacin, cefalexina y cefalosporinas de tercera generación con una alta carga de cepas productoras de BLEE de tipo CTX-M, así como de pAmpC de tipo CMY-2; por

lo que, al igual que otros antibióticos de importancia crítica en medicina humana, el uso de éstos debe estar restringido (Pfaller y Sgreti, 2006; Moreno *et al.*, 2008; Regula *et al.*, 2009; Damborg *et al.*, 2011). Particularmente, se ha determinado que el tratamiento antibiótico administrado hasta un año previo al muestreo constituye un factor de riesgo para la adquisición de enterobacterias productoras de BLEE (Belas *et al.*, 2015). En contraste, una evaluación previa estableció una ventana de 3 meses después del final de la terapia como factor de riesgo (Gandolfi-Decristophoris *et al.*, 2013). Estas variaciones se basan en la diferencia de los mecanismos de acción y espectro de los antibióticos; sin embargo, resulta imprescindible la implementación de estrategias concretas para el control de la resistencia bacteriana en centros veterinarios; tales como la concientización de los propietarios sobre las consecuencias del uso de antibióticos sin supervisión médica, la prescripción adecuada de medicamentos y la aplicación de normas de bioseguridad en ambientes hospitalarios (Schmidt *et al.*, 2018). En el presente estudio no se estableció asociación estadísticamente significativa entre la colonización fecal por *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.* productoras de BLEE e historial de antibioticoterapia, por lo que se presume que sea debido a la falta de precisión de los datos proporcionados por los propietarios.

La relativa alta frecuencia de BLEE detectada en el presente estudio confirma la diseminación silenciosa de los mecanismos de resistencia bacteriana en la población de canes de Lima Metropolitana, lo cual indica la necesidad de establecer medidas preventivas en el país. Por otro lado, en vista de que en los últimos años la relación entre los canes y sus propietarios se ha vuelto más estrecha, también propone un alto riesgo para la población humana (Yousfi *et al.*, 2016). Prácticas tales como permitir el contacto oral o compartir alimentos con las mascotas evidencia que la transmisión interespecie es plausible (Damborg *et al.*, 2016; Ljungquist *et al.*, 2016). Considerando el efecto perjudicial de las enterobacterias productoras de BLEE sobre antibióticos de importancia crítica en medicina humana, la identificación de estos microorganismos resulta prioritaria en comparación con otros mecanismos de resistencia (Breijyeh *et al.*, 2020). Se sugiere establecer como proceso rutinario en laboratorios veterinarios

de diagnóstico la identificación de BLEE en muestras microbiológicas, así como la ejecución de estudios epidemiológicos de BLEE que involucren simultáneamente a canes y propietarios. Considerando los resultados obtenidos en el presente estudio, el cultivo en el agar cromogénico HiCrome™ ESBL y DDST constituyen pruebas de alta reproductividad para el diagnóstico presuntivo y confirmación de BLEE, respectivamente. Cabe mencionar que las limitantes del presente estudio fue la ausencia de un antibiograma adicional para la detección de otros mecanismos de resistencia y de la identificación molecular de las variantes de BLEE; por ende, se recomienda la realización de estos procedimientos en investigaciones futuras.

CONCLUSIONES

- Se evidenció la presencia de *E. coli* y *Klebsiella spp.* productoras de BLEE en muestras fecales de perros clínicamente sanos de la Clínica Veterinaria Docente Cayetano Heredia.
- De una muestra de 58 canes, 26 fueron confirmados como portadores de enterobacterias productoras de BLEE. Se obtuvieron en total 120 y 16 cepas de *E. coli* y *Klebsiella spp.* productoras de BLEE, respectivamente; no obstante, se descartó la presencia de *Enterobacter spp.*
- Se determinó una frecuencia general de enterobacterias productoras de BLEE en perros clínicamente sanos del 44.83%; hallándose particularmente un valor del 44.83% y 6.89% en cuanto a *E. coli* y *Klebsiella spp.*, respectivamente.
- Se estableció relación estadísticamente significativa entre los canes hembras y la colonización fecal por *E. coli* y *Klebsiella spp.* productoras de BLEE. Por otro lado, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas en las otras variables exploradas (raza, grupo étnico e historial de antibioticoterapia).

RECOMENDACIONES

- El presente estudio evaluó únicamente a la población canina sana de un centro veterinario ubicado en Lima Norte; por lo que se sugiere la replicación de la prueba en otras subregiones de Lima Metropolitana. Los hallazgos permitirán tener un diagnóstico más detallado de la presencia de BLEE en el departamento.
- Como principal medida para la vigilancia epidemiológica de BLEE en el país, se propone la identificación de las variantes de BLEE y la evaluación de la transmisión de BLEE entre los perros y sus propietarios mediante pruebas genómicas.

LITERATURA CITADA

- Aguilar-Gamboa FR, Santamaría-Veliz O, Vargas NE, Silva-Díaz H. 2016. Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en muestras fecales de humanos y mascotas. Chiclayo, Perú. Rev Peru Med Exp Salud Pública 33 (2): 373-5.
- Ahmed LN, Price LB, Graham JP. 2015. An exploratory study of dog park visits as a risk factor for exposure to drug-resistant extra-intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC). BMC Res Notes 8: 137.
- Albrechtova K, Dolejska M, Cizek A, Tausova D, Klimes J, Bebor L, *et al.* 2012. Dogs of Nomadic pastoralists in northern Kenya are reservoirs of plasmid-mediated Cephalosporin- and Quinolone-Resistant *Escherichia coli*, including pandemic clone B2-O25-ST131. Antimicrob Agents Chemother 56 (7): 4013–4017.
- Allcock S, Young EH, Holmes M, Gurdasani D, Dougan G, Sandhu MS, *et al.* 2017. Antimicrobial resistance in human populations: Challenges and opportunities. Glob Health Epidemiol Genomics 2: e4.
- Aslantaş Ö, Yilmaz EŞ. 2017. Prevalence and molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and plasmidic AmpC β -lactamase (pAmpC) producing *Escherichia coli* in dogs. J Vet Med Sci 79 (6): 1024-1030.
- Belas A, Salazar AS, da Gama LT, Couto N, Pomba C. 2015. Risk factors for faecal colonisation with *Escherichia coli* producing extended-spectrum and plasmid-mediated AmpC β -lactamases in dogs. Vet Rec 175 (8): 202.

- Bogaerts P, Huang TD, Bouchahrouf W, Bauraing C, Berhin C, Garch FE, *et al.* 2015. Characterization of ESBL- and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* from diseased companion animals in Europe. *Microb Drug Resist* 21 (6): 643-650.
- Bou G, Chaves F, Oliver A, Oteo J. 2015. Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes. Madrid: SEIMC. *Procedimientos en Microbiología Clínica* N° 55. 98 p.
- Breijyeh Z, Jubeh B, Karaman R. 2020. Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. *Molecules* 25 (6): 1340.
- Carvalho AC, Barbosa AV, Arais LR, Ribeiro PF, Carneiro VC, Cerqueira AM. 2016. Resistance patterns, ESBL genes, and genetic relatedness of *Escherichia coli* from dogs and owners. *Braz J Microbiol* 47: 150-158.
- Chattopadhyay A. 2020. Microbial pathogenesis and antimicrobial drug resistance. En: Siddhardha B, Dyavaiah M, Syed A, editores. *Model organisms for microbial pathogenesis, biofilm formation and antimicrobial drug discovery*. Singapur: Springer Nature Singapore. p 79-97.
- Cortez V. 2017. Aislamiento y caracterización de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y *Staphylococcus spp.* presentes en la carne molida comercializada en supermercados ubicados en el distrito de Miraflores, Lima-Perú: Evidencia de cepas productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y meticilino resistencia. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia. 28 p.
- Cozma AP, Carp-Cărare M, Ciocan OA, Carp-Cărare C, Guguianu E, Rîmbu C, *et al.* 2015. The prevalence of positive ESBL *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains in the dogs in the Iași Paddock. *Lucr Șt Med Vet* 48 (2): 74-80.

- Damborg P, Gaustad IB, Olsen JE, Guardabassi L. 2011. Selection of CMY-2 producing *Escherichia coli* in the faecal flora of dogs treated with cephalexin. *Vet Microbiol* 151: 404-408.
- Damborg P, Morsing MK, Petersen T, Bortolaia V, Guardabassi L. 2015. CTX-M-1 and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* in dog faeces from public gardens. *Acta Vet Scand* 57: 83.
- Damborg P, Broens EM, Chomel BB, Guentherx S, Pasmansk F, Wagenaar JA, *et al.* 2016. Bacterial zoonoses transmitted by household pets: State-of-the-art and future perspectives for targeted research and policy actions. *J Comp Pathol* 155 (1): S27-S40.
- Derakhshandeh A, Eraghi V, Borojoni AM, Niaki MA, Zare S, Naziri Z. 2018. Virulence factors, antibiotic resistance genes and genetic relatedness of commensal *Escherichia coli* isolates from dogs and their owners. *Microb Pathog* 116: 241-245.
- Domingos D. 2010. Detecção e identificação de beta-lactamase de espectro-estendido (ESBL) em cepas de *Escherichia coli* isoladas de cães. Tesis de Maestría. São Paulo: Universidade Estadual de Campinas. 117 p.
- Dorado-García A, Smid JH, van Pelt W, Bonten MJM, Fluit AC, van den Bunt G, *et al.* 2018. Molecular relatedness of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from humans, animals, food and the environment: a pooled analysis. *J Antimicrob Chemother* 73 (2): 339–347.
- [EUCAST] European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2017. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Sweden: EUCAST. Resistance mechanisms. 43 p.

- [EUCAST] European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2019. EUCAST disk diffusion method. Sweden: EUCAST. Antimicrobial susceptibility testing. 21 p.
- Ewers C, Grobbel M, Bethe A, Wieler LH, Guenther S. 2011. Extended-spectrum beta-lactamases-producing gram-negative bacteria in companion animals: Action is clearly warranted! Berl Munch Tierarztl Wochenschr 124 (3-4): 94–101.
- Ewers C, Stamm I, Pfeifer Y, Wieler LH, Kopp PA, Schønning K, *et al.* 2014. Clonal spread of highly successful ST15-CTX-M-15 *Klebsiella pneumoniae* in companion animals and horses. J Antimicrob Chemother 69 (10): 2676–2680.
- Friedmann R, Raveh D, Zartzer E, Rudensky B, Broide E, Attias D, *et al.* 2009. Prospective evaluation of colonization with extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* among patients at hospital admission and of subsequent colonization with ESBL-producing *Enterobacteriaceae* among patients during hospitalization. Infect Control Hosp Epidemiol 30 (6): 534–539.
- Ganddolfi-Decristophoris P, Petrini O, Ruggeri-Bernardi N, Schelling E. 2013. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in healthy companion animals living in nursing homes and in the community. Am J Infect Control 41: 831-835.
- García JE, Gómez-Lus ML, Rodríguez FC, Torreblanca A. 1993. Recogida, transporte y conservación de las muestras. Madrid: SEIMC. Procedimientos en Microbiología Clínica N° 1. 45 p.
- García CS, Pardos de la Gándara M, Castillo FJ. 2010. Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. Enferm Infecc Microbiol Clin 28 (1): 12-18.

- García-Tello A, Gimbernat H, Redondoa C, Arana DM, Cacho J, Angulo JC. 2014. Betalactamasas de espectro extendido en las infecciones del tracto urinario causadas por enterobacterias: Aproximación a su conocimiento y pautas de actuación. *Actas Urol Esp* 38 (10): 678-684.
- Gumus C, Celik C, Kahraman BB, Sigirci BD, Ak S. 2017. Determination of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) and AmpC beta-lactamase producing *Escherichia coli* prevalence in faecal samples of healthy dogs and cats. *Revue Méd Vét* 168 (1-3): 46-52.
- HiMedia. 2012. HiCrome™ ESBL Agar Supplement. Mumbai: HiMedia. Technical Data FD278. 1 p.
- HiMedia. 2013. HiCrome ESBL Agar Base. Mumbai: HiMedia. Technical Data M1829. 2 p.
- Hordijk J, Schoormans A, Kwakernaak M, Duim B, Broens E, Dierikx C, *et al.* 2013. High prevalence of fecal carriage of extended spectrum β -lactamase/AmpC-producing *Enterobacteriaceae* in cats and dogs. *Front Microbiol* 4: 242.
- Kumar S. 2012. Enterobacteriaceae: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus* and Other Genera. En: Jaypee Brothers Medical Publishers, editores. Textbook of Microbiology. 1ª ed. India: Brothers Medical Publishers. p 347-361.
- Li S, Liu J, Zhou Y, Miao Z. 2017. Characterization of ESBL-producing *Escherichia coli* recovered from companion dogs in Tai'an, China. *J Infect Dev Ctries* 11 (3): 282-286.
- Ljungquist O, Ljungquist D, Myrenås M, Rydén C, Finn M, Bengtsson B, *et al.* 2016. Evidence of household transfer of ESBL-/pAmpCproducing *Enterobacteriaceae* between humans and dogs – a pilot study. *Infection Ecology and Epidemiology* 6: 31514.

- Ljungquist O, Schönbeck J, Riesbeck K, Tham J. 2019. Risk factors associated with prolonged intestinal colonization of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* – a prospective cohort study. *Infect Drug Resist* 12: 2637–2648.
- Maeyama Y, Taniguchi Y, Hayashi W, Ohsaki Y, Osaka S, Koide S, *et al.* 2018. Prevalence of ESBL/AmpC genes and specific clones among the third-generation cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* from canine and feline clinical specimens in Japan. *Vet Microbiol* 216: 183-189.
- Makarewicz O, Stein C, Pfister W, Löffler B, Pletz M. 2015. Identification Methods - An Overview. In: Popp J, Bauer M, editors. *Modern Techniques for Pathogen Detection*. Weinheim: Wiley Blackwell. p 19-53.
- Melo LC, Oresco C, Leigue L, Netto HM, Melville PA, Benites NR, *et al.* 2018. Prevalence and molecular features of ESBL/pAmpC-producing *Enterobacteriaceae* in healthy and diseased companion animals in Brazil. *Vet Microbiol* 221: 59-66.
- Mohammad Sharif N, Sreedevi B, Chaitanya RK, Sreenivasulu D. 2017. Beta-lactamase antimicrobial resistance in *Klebsiella* and *Enterobacter* species isolated from healthy and diarrheic dogs in Andhra Pradesh, India. *Vet World* 10 (8): 950–954.
- Moreno A, Bello H, Guggiana D, Dominguez M, Gonzalez G. 2008. Extended-spectrum beta-lactamases belonging to CTX-M group produced by *Escherichia coli* strains isolated from companion animals treated with enrofloxacin. *Vet Microbiol* 129: 203-208.
- Nuangmek A, Rojanasthien S, Chotinun S, Yamsakul P, Tadee P, Thamlikitkul V, *et al.* 2018. Antimicrobial Resistance in ESBL-Producing *Escherichia coli* Isolated from Layer and Pig Farms in Thailand. *Acta Sci Vet* 46 (1): 1538.

- Ortega-Paredes D, Haro M, Leoro-Garzón P, Barbae P, Loaizac K, Mora F, *et al.* 2019. Multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from canine faeces in a public park in Quito, Ecuador. *J Glob Antimicrob Resist* 18: 263–268.
- Parija SC. 2012. Coliforms. En: Elsevier, editores. *Textbook of Microbiology and Immunology*. 2ª edición. India: Elsevier. p 251-268.
- Pereckaitea L, Tatarunas V, Giedraitiene A. 2018. Current antimicrobial susceptibility testing for beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in clinical settings. *J Microbiol Methods* 152: 154–164.
- Pérez P, Galán F, Gutiérrez D, Guerrero I. 2014. Infecciones por enterobacterias. *Medicine* 11 (55): 3276-3282.
- Pfaller MA, Segreti J. 2006. Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum b-lactamases. *Clin Infect Dis* 42 (4): S153-S163.
- Pomba C, Rantala M, Greko C, Baptiste KE, Catry B, van Duijkeren E, *et al.* 2017. Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. *J Antimicrob Chemother* 72 (4): 957–968.
- Pournaras S, Zarkotou O, Poulou A, Kristo I, Vrioni G, Themeli-Digalaki K, *et al.* 2013. A combined disk test for direct differentiation of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in surveillance rectal swabs. *J Clin Microbiol* 51 (9): 2986 –2990.
- Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, *et al.* 2017. The *Enterobacteriaceae*. En: Wolters Kluwer, editor. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 7ª ed. Philadelphia: Wolters Kluwer. p 586-96.

- Razaghi M, Torabi P, Mojarad EN, Tajeddin E, Sherafat SJ, Rashidan M, *et al.* 2012. Fecal carriage of *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* as major reservoirs of clinically important resistance markers. *J Paramed Sci* 3 (2): 25-30.
- Regula G, Torriani K, Gassner B, Stucki F, Muntener CR. 2009. Prescription patterns of antimicrobials in veterinary practices in Switzerland. *J Antimicrob Chemother* 63: 805-811.
- Riedel S, Boire N, Carson KA, Vadlamudi A, Khuvis J, Vadlamudi V, *et al.* 2019. A survey of antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* isolated from the Chesapeake Bay and adjacent upper tributaries. *Microbiology Open* 8 (9): e00839.
- Rocha-Gracia RC, Cortés-Cortés G, Lozano-Zarain P, Bello F, Martínez-Laguna Y, Torres C, *et al.* 2015. Faecal *Escherichia coli* isolates from healthy dogs harbour CTX-M-15 and CMY-2 β -lactamases. *Vet J* 203 (3): 315-319.
- Rota A, Milani C, Corrà M, Drigo I, Borjesson S. 2012. Misuse of antimicrobials and selection of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* strains in breeding kennels: genetic characterization of bacteria after a two-year interval. *Reprod Domest Anim* 48: 1–6.
- Rubin JE, Pitout JDD. 2014. Extended-spectrum β -lactamase, carbapenemase and AmpC producing *Enterobacteriaceae* in companion animals. *Vet Microbiol* 170 (1-2): 10-18.
- Rupp ME, Fey PD. 2003. Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL)-Producing *Enterobacteriaceae*: Considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. *Drugs* 63 (4): 353-365.
- Sallem RB, Gharsa H, Slama KB, Rojo-Bezares B, Estepa V, Porres-Osante N, *et al.* 2013. First detection of CTX-M-1, CMY-2, and QnrB19 resistance mechanisms in fecal *Escherichia coli* isolates from healthy pets in Tunisia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 13 (2): 98-102.

- Sampaio JLM, Gales AC. 2016. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. *Braz J Microbiol* 47 (1): 31–37.
- Schaufler K, Bethe A, Lübke-Becker A, Ewers C, Kohn B, Wieler LH, *et al.* 2015. Putative connection between zoonotic multiresistant extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in dog feces from a veterinary campus and clinical isolates from dogs. *Inf Ecol Epidem* 5 (1): 25334.
- Schmidt VM, Nuttall T, Pinchbeck GL, McEwan N, Dawson S, Williams NJ, *et al.* 2015. Antimicrobial resistance risk factors and characterisation of faecal *E. coli* isolated from healthy Labrador retrievers in the United Kingdom. *Pre Vet Med* 119 (1-2): 31-40.
- Schmidt VM, Pinchbeck G, McIntyre KM, Nuttall T, McEwan N, Dawson S, *et al.* 2018. Routine antibiotic therapy in dogs increases the detection of antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 73: 3305–3316.
- Schwarz S, Noble WC. 1999. Aspects of bacterial resistance to antimicrobial agents used in veterinary dermatological practice. *Vet Dermatol* 10: 163–176.
- Schwarz S, Cloeckert A, Roberts MC. 2006. Mechanisms and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents. In: Aarestrup FM, editors. *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*. Washington, DC: ASM Press. p 73–98.
- [SFM] Société Française de Microbiologie. 2019. *Recommandations 2019*. Paris: SFM. V.1.0 Janvier. 144 p.

- Sharif NM, Sreedevi B, Chaitanya RK, Sreenivasulu D. 2017a. Beta-lactamase antimicrobial resistance in *Klebsiella* and *Enterobacter* species isolated from healthy and diarrheic dogs in Andhra Pradesh, India. *Vet World* 10 (8): 950-954.
- Sharif NM, Sreedevi B, Chaitanya RK y Srilatha C. 2017b. Detection of extended spectrum beta-lactam (ESBL) resistance in *Pseudomonas* species of canine origin. *The Pharma Innovation Journal* 6 (9): 89-93.
- So JH, Kim J, Bae IK, Jeong SH, Kim SH, Lim SK, *et al.* 2012. Dissemination of multidrug-resistant *Escherichia coli* in korean veterinary hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 73 (2):195-199.
- Silva KC, Knöbl T, Moreno AM. 2013. Antimicrobial resistance in veterinary medicine: Mechanisms and bacterial agents with the greatest impact on human health. *Braz J Vet Res Anim Sci* 50 (3): 171-183.
- Sullivan R, Schaus D, John M, Delport JA. 2015. Extended spectrum beta-lactamases: A minireview of clinical relevant groups. *J Med Microb Diagn* 4 (4): 203.
- Sun Y, Zeng Z, Chen S, Ma J, He L, Liu Y, *et al.* 2010. High prevalence of bla CTX-M extended-spectrum β -lactamase genes in *Escherichia coli* isolates from pets and emergence of CTX-M-64 in China. *Clin Microbiol Infect* 16 (9): 1675-1481.
- Tamang MD, Nam HM, Jang GC, Kim SR, Chae MH, Jung SC, *et al.* 2012. Molecular characterization of extended-spectrum- β -lactamase-producing and plasmid-mediated AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from stray dogs in South Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 56 (5): 2705-2712.

- Teklu DS, Legese MH, Eshetu K, Negeril AA, Fentaw S, Addis T, *et al.* 2019. Comparison of double disk synergy test and combination disk test methods for the detection of extended-spectrum beta-lactamase production among *Enterobacteriaceae*. *EC Microbiology* 15 (6): 411-420.
- Theuretzbacher U. 2013. Global antibacterial resistance: The never-ending story. *J Glob Antimicrob Resist* 1: 63–69.
- Tuerena I, Williams MJ, Nutall T, Pinchbeck G. 2016. Antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in hospitalised companion animals and their hospital environment. *J Small Anim Pract* 57 (7): 339–347.
- Wedley AL, Maddox TW, Westgarth C, Coyne KP, Pinchbeck GL. 2011. Prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in dogs in a cross-sectional, community-based study. *Vet Rec* 168 (13): 354.
- [WHO] World Health Organization. 2014. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. Ginebra: WHO. ISBN 978 92 4 156474 8. 232 p.
- Yousfi M, Mairi A, Touati A, Hassissene L, Brasme L, Guillard T, *et al.* 2016. Extended spectrum β -lactamase and plasmid mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* fecal isolates from healthy companion animals in Algeria. *J Infect Chemother* 22 (7): 431-435.
- Zogg AL, Simmen S, Zurfluh K, Stephan R, Schmitt SN, Nüesch-Inderbinen M. 2018. High prevalence of extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* among clinical isolates from cats and dogs admitted to a veterinary hospital in Switzerland. *Front Vet Sci* 5 (62): 1-8.