



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Enterobacterias aisladas de infecciones urogenitales de perro y gato, evolución temporal de la resistencia a los antibióticos y valoración de los resultados respecto a la salud humana y animal.

Enterobacteria isolated from urogenital infections of cats and dogs, the temporal evolution of the antibiotic resistance and assessment of the results regarding to human and animal health.

Autor/es

M^a Concepción del Hoyo Ramírez

Director/es

M^a del Carmen Simón Valencia

Facultad de Veterinaria

2018

ÍNDICE

1. Resumen	3-4
2. Introducción	4
2.1 Bacterias frecuentes en infecciones de perro y gato	4-6
2.2 Antibióticos	6-7
2.3 Resistencia a los antimicrobianos	7-10
2.4 Antibióticos estudiados y sus mecanismos de resistencia	10-13
3. Objetivos	13
4. Material y métodos	13
4.1 Tipo de estudio	13
4.2 Animales del estudio	13
4.3 Factores considerados en el estudio	13-14
4.4 Colección de las muestras	14
4.5 Aislamiento e identificación bacteriana	14
4.6 Test de Kirby-Bauer	14-15
4.7 Análisis estadístico de los datos	15
5. Resultados y Discusión	15
5.1 Análisis de la resistencia a antibióticos en los aislados de <i>E. coli</i> , independiente del año de estudio.....	15-26
5.2 Análisis de la susceptibilidad a los antibióticos en el conjunto de los <i>E. coli</i> aislados en los años 2015 y 2016	27
5.3 Análisis de la evolución temporal de la susceptibilidad a antibióticos de los <i>E. coli</i> aislados en 2015 y 2016 en relación con los factores considerados en el estudio	27-29
5.4 Relación de la resistencia cruzada de los <i>E. coli</i> aislados hacia los antibióticos usados en el estudio	29-31
6. Conclusiones	31
7. Valoración personal	32
8. Bibliografía	33-35

1. RESUMEN

Introducción y objetivos. Los antibióticos son fármacos fundamentales para tratar enfermedades bacterianas humanas y de los animales. La resistencia de las bacterias a los antibióticos se conoce desde que se inició su uso, y a lo largo de los años ha aumentado progresivamente por el abuso y mal uso de estos fármacos. Actualmente se le considera un problema prioritario para la salud pública y animal.

El objetivo del estudio es analizar la evolución temporal y las características de la resistencia a los antibióticos de *Escherichia coli* aislada de casos clínicos de infecciones caninas y felinas, en los años 2015 y 2016, y relacionarlo con posibles consecuencias para la salud humana.

Material y métodos. Es un estudio retrospectivo de la resistencia a antibióticos de 49 aislados de *E. coli* obtenidos de perros y gatos que sufrían diversas infecciones. Los datos clínicos y epidemiológicos de estos animales fueron analizados.

Resultados: la prevalencia de *E. coli* resistentes ha oscilado desde un 20,17% para pradofloxacina y trimetoprim-sulfametoxazol a un 89,58% para doxicilina y 78,57% para ampicilina. En general no había diferencias significativas entre los aislados de gatos y perros, aunque en los gatos siempre fue algo inferior. En general, los porcentajes de *E. coli* resistentes en 2015 eran superiores a los de 2016 para la AMC, incluso relacionado con los factores considerados en el estudio, si bien no son siempre diferencias significativas.

Conclusiones: Se observó una prevalencia elevada de resistencia a antibióticos en los *E. coli* analizados, similar a las detectadas en países del sur de Europa. Si bien se observa una ligera tendencia a la disminución entre el año 2015 y 2016 en algunos antibióticos. Se confirma la necesidad de seguir con campañas conjuntas de concienciación sobre el uso prudente de antibióticos para los animales domésticos y las personas.

SUMMARY

Introduction and objectives. Antibiotics are essential drugs to treat bacterial diseases in human and animals. The resistance of bacteria to antibiotics is known since its use began, and has increased progressively over the years by the abuse and misuse of these drugs. Currently it is considered a priority problem for public and animal health. The objective of the study is to analyze the temporal evolution and the characteristics of the resistance to antibiotics of *Escherichia coli* isolated from clinical cases of canine and feline infections, in the years 2015 and 2016, and relate it to possible consequences for the human health.

Material and methods. It is a retrospective study of the antibiotic resistance of 49 isolates of *E. coli* from dogs and cats suffering various infections. The clinical and epidemiological data of these animals were analyzed.

Results: the prevalence of *E. coli* resistant run from 20.17% for pradofloxacina and trimetoprim-sulfamethoxazole to 89,58% for doxycycline and 78,57% for ampicillin. In general there are no significant differences between isolates of cats and dogs, although it was always somewhat lower in cats. In general the

percentages of *E. coli* resistant in 2015 were superior to 2016 for the amoxicilina-clavulánico, even related to the factors considered in the study, although they are not always significant differences.

Conclusions: it was observed a high prevalence of antibiotic resistance in the *E. coli* analyzed, similar to that detected in countries of southern Europe. There is a slight tendency to decrease antibiotic resistance between the year 2015 and 2016. Confirms the need to continue with joint campaigns of awareness-raising on the prudent use of antibiotics for pets and people.

Palabras clave: resistencia a antibióticos, *Escherichia coli*, perro, gato epidemiología

Key words: antibiotic resistance, *Escherichia coli*, dog, cat, epidemiology

2. INTRODUCCIÓN

Es bien reconocido el problema de la resistencia a los antibióticos en el ámbito veterinario en Europa es preocupante, y sobre todo en relación con las bacterias Gram negativas. Esto es especialmente importante en los países del sur de Europa, en los que todavía se aprecia el aumento de los porcentajes de aislados resistentes para algunos antibióticos. De hecho, la resistencia a los antimicrobianos, en general, es un problema serio a nivel mundial, lo que ha dado lugar a promover campañas de concienciación en el marco del concepto “Una Salud”, en el que todos los estamentos y profesionales directamente o indirectamente implicados en el uso de antimicrobianos, se ha movilizado para controlar y mentalizar a la población humana, a los profesionales veterinarios y otros profesionales relacionados con la Salud, así como en el control de la resistencia en el medio ambiente. ^[9]

2.1 Bacterias frecuentes en infecciones del perro y el gato

Una mayoría de las infecciones habituales caninas y felinas que llegan a los hospitales veterinarios están producidas por bacterias de los géneros *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp, *Neisseria* spp, *Enterococcus* spp, *Micrococcus* spp, *Corynebacterium* spp, *Pasteurella* spp, *Pseudomonas* spp, *Acinetobacter* spp y *Enterobacterias* (*E. coli*, *Klebsiella* spp y *Proteus* spp,).^[11]

Enterobacterias:

La familia Enterobacteriaceae constituye un grupo grande y heterogéneo de bacterias gram-negativas. Suelen ser saprofitas habituales de la flora intestinal del tubo digestivo de los animales y personas, aunque son ubicuas, encontrándose de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación. *Escherichia coli* (*E. coli*), es el microorganismo más prevalente de esta familia.^[19]

Se caracterizan por tener poder patógeno primario y secundario, tanto a nivel intestinal como en otras localizaciones extraintestinales. Cuentan con factores de virulencia (pilis, fimbrias o adhesinas, exotoxinas, entero y citotoxinas, endotoxinas, sideróforos, proteínas de membrana unidas a lipopolisacáridos (LPS) que son también un factor de virulencia). Incluso, algunas enterobacterias producen cápsula (formada por polisacáridos y ácido colánico), que aumenta su supervivencia al escapar de la fagocitosis.^[19]

Las enterobacterias están implicadas en una alta proporción de las infecciones del tracto urinario (ITU) y genital. Se considera que las ITU pueden afectar a un 10-14 % de los perros que acuden al veterinario, y a <3% de los gatos, en la mayoría de los casos, son causadas por una sola especie bacteriana siendo la más prevalente *E. coli*, y hasta un 20 % pueden ser infecciones bacterianas mixtas (2 o más especies), junto a *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*, *Enterobacter spp*, *Proteus spp*, *Klebsiella spp* y *Pseudomonas spp*.^[16]

Entre los años 2008 y 2013 se realizó un estudio inter-europeo en el que se investigó la resistencia de bacterias aisladas de infección urinaria de animales de compañía. Se estudiaron 22.256 bacterias a partir de perros y gatos procedentes de 14 países, en la que España participó con 230 aislados. Se observó que la prevalencia de los géneros implicados eran similares en los perros y gatos y en ambos la prevalencia de *E. coli* era la más alta (59% en gatos y 60% en perros).^[20]

En general, la importancia de *E. coli* en las infecciones caninas y felinas, así como su ubicuidad, le convierten en una bacteria centinela de la resistencia a los antibióticos ^[23]. El conocimiento de la evolución en la resistencia de los aislados de *E. coli* puede ayudar a utilizar mejor los antibióticos y reducir la aparición de multirresistencia ^[32]. A esto se debe añadir que la estrecha convivencia de los animales de compañía con las personas, convierten a estas bacterias en elementos de transmisión de la resistencia entre ambos, habiéndose descrito casos de transmisión en los dos sentidos. ^[16]

Escherichia coli era predominante (53%) en casos de UTI canina en California ^[34], y en el estudio inter-europeo era un 60% ^[20]. Mientras que en el gato ^[16], en infección de la porción inferior del aparato urinario (Australia), la proporción era de un 37%, que también difiere notablemente de lo encontrado en el estudio inter-europeo (59%).

Las **UTI** son importantes debido a que *E. coli* es el agente aislado con mayor frecuencia, que en los últimos años aumentaba su resistencia a diferentes antibióticos (fluoroquinolonas (FQs), cefalosporinas de tercera generación (3GC) y β -lactámicos potenciados con ácido clavulánico), algunos de ellos son usados en animales y personas. Se ha demostrado que aislados patógenos de *E. coli* de origen canino pueden interactuar con las células epiteliales de la vejiga humana, sugiriendo su potencial zoonótico. Si bien se ha observado que la transmisión de *E. coli* de origen humano hacia los perros de su entorno directo, es más probable (antropozoonosis), que en sentido contrario. ^[31]

En el estudio inter-europeo más reciente ^[20], la resistencia de las bacterias aisladas de infecciones de países del Sur de Europa, mostraban niveles de resistencia más elevados que en las de países del Norte. Los *E. coli* multirresistentes (MDR), eran más prevalentes en los países del Sur. Los valores de resistencia a FQs de los aislados de *E. coli* procedentes de Bélgica, Dinamarca, Francia y Holanda, descendían de forma significativa en el período de estudio, mientras que se observaba el aumento de la resistencia amoxicilina-clavulánico (AMC) y gentamicina (GEN) en los *E. coli* aislados de Holanda y Suiza (respectivamente). En España, los valores de resistencia de los aislados de *E. coli* a AMC, FQs, SxT (trimethoprim-sulfametoxazol), y el

desarrollo de MDR, se encontraba en valores entre el 25 a 50%, y las de las cefalosporinas 3GC y GEN, se encontraban entre el 10 y 25%.^[20]

Se considera que las **infecciones genitales** suelen estar relacionadas con las urinarias, de modo que en ambos casos, el origen de la infección es la flora local próxima a la uretra y vagina.^[16]

2.2 Antibióticos

Son medicamentos que permiten tratar infecciones bacterianas y por Mycoplasmas. Pueden tener un origen biológico (producidos de forma natural por otros microorganismos o sintético. Se caracterizan por poseer “toxicidad selectiva”, ya que no afectan o son relativamente inocuos para las células del huésped. La toxicidad selectiva se logra gracias a las diferencias existentes entre el huésped y el microorganismo invasor. Desde el descubrimiento de la penicilina y el inicio de su uso en el control de infecciones (1943), los antibióticos han contribuido a la reducción de la mortalidad y morbilidad debida a las enfermedades bacterianas a nivel mundial. Además tienen otras funciones como la prevención de infecciones en situaciones como la cirugía, los trasplantes de órganos, enfermedades inmunodepresoras, etc. Presentan dos **patrones básicos de actividad bactericida**.^[19]

- 1) Antibióticos **dependientes de la concentración que alcanzan** en el organismo (Aminoglucósidos, fluoroquinolonas, azitromicina, tetraciclinas, vancomicina, quinupristina-dalfopristina y metronidazol.)
- 2) Antibióticos **dependientes del tiempo** de actuación en la zona donde se ha establecido la infección, entre los que se encuentran los antibióticos β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactams y carbapenems), clindamicina y la mayoría de los macrólidos.

Mecanismo de acción de los antibióticos.^[17, 19]

- **Antibióticos que afectan la biosíntesis de la pared bacteriana** (Betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas), Glucopéptidos (vancomicina, teicoplanina), bacitracina y fosfomicina). Impiden los sucesivos pasos de la síntesis de la pared bacteriana y como consecuencia, la célula bacteriana no resiste los cambios osmóticos, se hincha y estalla.
- **Antibióticos que afectan la membrana citoplasmática** (Anfotericina B, Nistatina, Imidazoles, Polimixinas). Actúan como detergentes o tensioactivos catiónicos y provocan una grave alteración de la membrana celular, modificando la permeabilidad y permitiendo el escape de aminoácidos intracelulares, purinas, pirimidinas, y otras moléculas fundamentales para la vida celular. Todos estos antibióticos son líticos y tienen cierto potencial tóxico ya que son capaces de unirse con los lípidos de membranas citoplasmáticas de las células de los mamíferos.
- **Antibióticos que afectan la biosíntesis proteica.** Se dividen en tres grupos:
 - Los que se fijan en la porción **50S** del **ARN ribosómico** inhibiendo la transpeptidación, (cloranfenicol y macrólidos). O bien, en la porción **30S del ARN mensajero**, inhibiendo la síntesis proteica al no

reconocer el codón inicial (aminoglucósidos). Y a nivel de la porción **30S** del **ARN de transcripción**: Rifampicina y Rifamicina, Tetraciclinas, Aminoglucósidos, Cloranfenicol, Macrólidos, Lincosamidas.

- **Antibióticos que afectan la síntesis de ácidos nucleicos bacterianos.** Inhiben la biosíntesis del ADN bacteriano mediante la inhibición de la ADN girasa (ácido nalidíxico y fluoroquinolonas), o mediante la formación de compuestos tóxicos para las bacterias (Nitroimidazoles), Griseofulvina, 5 Fluorociosina.
- **Antibióticos que inhiben vías metabólicas.** Las Sulfamidas inhiben competitivamente la incorporación de PABA, impidiendo la síntesis de ácido fólico, la Trimetoprima inhibe la dihidrofolato-reductasa obstruyendo así la formación de ácido tetrahidrofólico.

2.3 Resistencia a los antimicrobianos:

La resistencia a los antimicrobianos es la capacidad de un microorganismo para no verse afectado por los efectos de un antibiótico o antimicrobiano y se relaciona con la presencia de mecanismos determinados genéticamente (adquiridos o por mutación). La calificación de una bacteria como susceptible o resistente se realiza en **laboratorio** con la demostración del fenotipo por medio de un punto de corte de inhibición del crecimiento bacteriano. Desde la perspectiva **clínica** se considera que se ha presentado resistencia bacteriana cuando el tratamiento antibiótico falla en su objetivo de curar al animal o persona enfermo, mientras que desde el punto de vista **microbiológico** se habla de resistencia al antibiótico cuando, tras un tratamiento, el microorganismo persiste. La resistencia a un antibiótico en concreto puede ser un hecho natural (resistencia intrínseca), como por ejemplo, la resistencia de las bacterias Gram-positivas a la colistina, o la de las enterobacterias a los glycopéptidos y linezolid. La resistencia adquirida tiene lugar de forma secundaria, en bacterias que eran inicialmente susceptibles.^[17, 19]

Para que se desarrolle la resistencia **cromosómica**, por **mutación**, se necesita el contacto persistente del microorganismo con el antibiótico, en una concentración de antibiótico que permita la supervivencia del microorganismo. La mutación espontánea puede acelerarse por acción de agentes físicos mutágenos o sustancias química

Resistencia adquirida o extracromosómica, afecta a algunas bacterias de una misma especie o cepa pero no a la totalidad. Se produce por incorporación de material genético fuera del cromosoma bacteriano. Los genes de resistencia se vehiculan en elementos móviles; los **plásmidos** son moléculas de doble cadena de ADN, independientes del cromosoma; y los **transposones** (“genes saltantes”), que son secuencias móviles de ADN que puede moverse a diferentes posiciones del genoma. La transposición es un proceso siempre presente en las poblaciones bacterianas, puede realizarse por diferentes mecanismos: Conjugación es la transferencia de genes entre bacterias sexualmente diferentes; requiere del contacto de célula a célula a través de pelos sexuales para la transmisión del factor R (gen extracromosómico de la resistencia). Transducción, que ocurre por medio de bacteriófagos, que transportan ADN de una bacteria a la otra. Transformación, entre bacterias homólogas, al producirse la lisis de una bacteria resistente, una porción de

ADN penetra la pared celular de una bacteria susceptible y ambos ADN se combinan. Transposición, que es el intercambio entre plásmidos, o de un plásmido hacia un cromosoma o hacia un bacteriófago sin necesidad de homología entre el donante y el receptor mediante transposones.

Mecanismos Bioquímicos Implicados en la Resistencia. ^[19]

- Disminución de la permeabilidad hacia el antibiótico.
- Inactivación enzimática del antibiótico.
- Modificación química de la diana del antibiótico.
- Síntesis de una nueva enzima resistente.

La aparición de resistencia a antibióticos es un hecho manifiesto y preocupante en el ámbito de la salud pública, ya que se ha detectado cada vez con más frecuencia la aparición de agentes patógenos para las personas que son capaces de resistir a la gran mayoría de los antibióticos existentes. Este problema se hace especialmente llamativo en el ámbito de la ganadería, ya que también en Sanidad Animal se está detectando un importante incremento de microorganismos que presentan resistencia a los antibióticos con un riesgo añadido, el de la transferencia de esa resistencia a las personas. ^[25]

La aparición de resistencia en los aislados de enterobacterias, y en particular de *E. coli*, es preocupante. El desarrollo de β -lactamasas de espectro extendido y carbapenemasas por parte de las enterobacterias en general, en los aislados del perro y el gato también pueden significar una amenaza constante a la salud animal y humana, tal y como demostró Bajaj et al, 2016 ^[2]. En un estudio a lo largo de tres años en la que la infección urinaria de la madre de una familia de 6 miembros, se presentó también en el perro 2 años más tarde y en otro año posterior. Se identificaron 14 clones entre los 6 miembros de la familia, el clon de la madre con UTI se encontró en las heces de otros 4 miembros de la familia, incluido el perro, y el clon que portaba el perro en el momento que desarrollo la UTI se encontró colonizando a 4 de los 5 miembros. ^[13], Cuando los animales y las personas adquieren o desarrollan bacterias resistentes, se constituyen en reservorios de las mismas y vectores o indicadores de la presencia de esas bacterias y los determinantes genéticos de la resistencia, en el medio ambiente. También se ha detectado que la persistencia en el medio ambiente de residuos de antibióticos o de microorganismos saprófitos capaces de resistir a la mayoría de los antibióticos jugarán un papel clave como transmisores de la resistencia a microorganismos patógenos en los que la actividad de los antibióticos es un aspecto clave ^[21]. Finalmente, la resistencia a antibióticos conlleva la “aparición de cepas bacterianas multirresistentes a antibióticos” y la “presencia de residuos” y contaminantes en subproductos de origen animal destinados a consumo humano y el consiguiente riesgo de su transmisión en esa cadena alimenticia y al medio ambiente. ^[15]

La resistencia a antibióticos ha pasado a ser uno de los desafíos más importantes a los que se enfrenta la Salud Pública humana y veterinaria. Es un problema global en aumento. La utilización de aguas de mala calidad, la falta de saneamiento, el aumento de la proporción de personas mayores en la población, asociado

al incremento de hospitalizaciones, cuidados terciarios y procedimientos médicos, así como las diferencias en el uso de antibióticos según la riqueza de los países, conlleva la incapacidad de los países subdesarrollados para conseguir antibióticos que combatan la resistencia creada a los de primera línea de tratamiento.^[9]

Existe un consenso global sobre el hecho de que el uso de antibióticos en Medicina Humana y Veterinaria es uno de los mecanismos de selección de estas resistencias. Además los animales pueden ser el reservorio de algunos microorganismos que pueden ser transferidos desde los animales a las personas (zoonosis). Todo ello ha motivado numerosas recomendaciones y diversas normativas sobre el uso de antimicrobianos tanto en animales como en la especie humana. Pero las medidas que se han tomado no han sido completamente eficaces. Una de las principales causas de la resistencia a los antimicrobianos es el uso inadecuado de los antibióticos (consumo para el tratamiento de enfermedades de origen no bacteriano), la administración inadecuada y el abuso de estos medicamentos. En numerosos países, sobre todo en los desarrollados, los agentes antimicrobianos son fáciles de conseguir, sin demasiadas restricciones.^[17]

Por ello, la OIE considera que es fundamental garantizar un acceso adecuado a agentes antimicrobianos eficaces para tratar las enfermedades animales, proteger la salud humana y garantizar la seguridad alimentaria.^[9]

Desde 2010, la OIE forma parte, junto con la OMS y la FAO, de la Alianza Tripartita. Sus acciones consisten en coordinar las estrategias de la lucha contra grandes problemas globales que involucran a los animales, el ecosistema y las personas. Las tres acciones prioritarias se centran en el control de la influenza como zoonosis, la lucha contra la antibiorresistencia y la rabia. En relación con la **resistencia a los antimicrobianos (AR)** las medidas se desarrollan con vistas a corto, medio y largo plazo, a escala mundial, y en apoyar su aplicación a escala nacional y regional, mediante la comunicación y movilización de sus socios públicos y privados, los gobiernos de los Países Miembros y la opinión pública. Así ha establecido un sistema de vigilancia sanitaria y de alerta precoz. Ésta colaboración ha llevado a la elaboración del plan de acción global sobre la resistencia a los antimicrobianos, en el que se destaca la importancia de las normas intergubernamentales de la OIE y apoya la aplicación, por parte de la Organización, de una base de datos mundial sobre el uso de los agentes antimicrobianos en los animales.^[9] La aplicación de las normas de la OIE implica, a escala nacional:

- El desarrollo y puesta en marcha de una **legislación adecuada** en cuanto al uso de los agentes antimicrobianos.
- El **trabajo conjunto de los profesionales sanitarios** del ámbito humano y animal a nivel nacional y global para desarrollar medidas políticas, estrategias y actividades en colaboración con otros partícipes en los sectores privados y públicos.
- **Despertar la conciencia** de los ciudadanos sobre el problema.

- **Reforzar las capacidades** de las naciones para hacer frente a la RA.
- Dar **apoyo a los países** para establecer las medidas de vigilancia e infraestructuras y redes reguladoras.
- **Sufragar la vigilancia** armonizada de la RA controlando a nivel global el uso de antimicrobianos.
- **Promover la investigación y desarrollo** de nuevos antimicrobianos, diagnósticos rápidos y vacunas que ayuden a prevenir y controlar la RA.
- Apoyar los esfuerzos para **luchar frente** a la circulación de **productos de poca calidad o falsos**.
- **Promover las medidas de prevención y control** de las infecciones que permitan ir reduciendo el uso de antimicrobianos.

A nivel de la **profesión veterinaria**, se propone:

- La buena gobernanza de los sistemas nacionales de sanidad animal
- Una profesión veterinaria bien capacitada y regulada por la ley

La profesión veterinaria, tiene una función crucial ante la resistencia a los antimicrobianos, por ello, la OIE también prevé **directrices relativas a la formación veterinaria**.

2.4 Antibióticos estudiados y sus mecanismos de resistencia:

Betalactámicos: Bactericidas que inhiben la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana, éste mecanismo de acción lo determina la presencia del anillo betalactámico. Su espectro de acción incluye Gram positivos, Gram negativos y espiroquetas. ^[19, 30] Las bacterias pueden desarrollar resistencia a los Betalactámicos mediante tres mecanismos que son independientes entre sí pero que pueden actuar sinérgicamente: Producción de enzimas inactivantes (**betalactamasas**, sobre todo TEM, TEM-1 y SHV), que representa el principal mecanismo de resistencia a los betalactámicos, estas enzimas hidrolizan el anillo betalactámico, de modo que el antibiótico no puede ejercer su acción en lasPBPs (Proteínas de unión a la Penicilina). **Alteración de la permeabilidad de la membrana** externa, aunque debe considerarse también que en algunos casos la resistencia obedece a la **asociación de distintos mecanismos** de resistencia. Un ejemplo de esta situación lo constituyen las cepas de *Escherichia coli*, con sensibilidad disminuida o resistencia a carbapenemasas.^[19]

La combinación de las **penicilinas con el ácido clavulánico** (u otros inhibidores de las β -lactamasas), incrementa la potencia, el espectro antibacteriano, y la resistencia a las betalactamasas, por lo que se utiliza en aquellos casos en los que los organismos han adquirido resistencia a las penicilinas como la amoxicilina y ampicilina), mediante la producción de betalactamasas. La resistencia a AMC es por varios mecanismos: producción de penicilinasas OXA-1, producción del AmpC plasmídica, hiperproducción de AmpC cromosómica y el inhibidor-resistente TEM (IRT).^[19]

Sin embargo la resistencia a las **cefalosporinas de 3ª generación (3GC)**, se produce por las llamadas β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs). Las primeras BLEEs de *E. coli* fueron variantes de TEM y SHV, con las que por sustitución de uno o varios aminoácidos, aumentan la capacidad de hidrolizar, tanto a las 3GC y

4GC y los monobactámicos. En los últimos años estas enzimas se ha reemplazado por BLEEs tipos CTX-M, que ahora son los más frecuentes y la mayoría inhiben a todos los inhibidores de la beta-lactamasa. Hay una gran diseminación de estos clones que producen tipos CTM-X. Hay cientos de variantes de BLEEs. Otras enzimas que afectan la susceptibilidad de las 3GC incluyen las variantes codificadas en plásmidos derivadas de las β -lactamasas tipo AmpC cromosómico. La más extendida es la CMY2, que es la más común en Europa. Otra amenaza importante es la emergencia de la resistencia al carbapenem, mediada por metalo- β -lactamasas (como VIM y NMD) o las serine- β -lactamasas (como KPC), que confieren la resistencia a todos los agentes Beta-lactámicos. Otra familia de β -lactamasas que aumenta son las enzimas tipo OXA, que confiere la resistencia a AMP y Cefalotín y que hidrolizan a oxacilina y cloxacilina y no son bien inhibidas por el ácido clavulánico. Cuando se producen solas, disminuyen la susceptibilidad de los Carbapenem y la resistencia de las penicilinas, pero normalmente, no a las cefalosporinas de amplio espectro. Desgraciadamente, son muchas las β -lactamasas y están aumentando. ^[18, 19]

Tetraciclinas: Bacteriostáticos o bactericidas dependiendo de la concentración, inhiben la síntesis proteica bacteriana por su unión reversible a la unidad ribosomal 30S y de esta forma bloquean la unión del aminoacil-tRNA al sitio aceptor en el complejo ribosoma-RNA, al sitio aceptor (A) del complejo formado por el mRNA y la subunidad 50S del ribosoma. La resistencia se desarrolla por diferentes mecanismos: disminución de acumulación del antibiótico en el citoplasma por el eflujo de bombeo, que es lo más frecuente en las enterobacterias. Utilización de proteínas de protección del ribosoma, que permite actuar al ARN-transferencia, (se observa en *Neisseria*, *Haemophilus*, *Campylobacter* y *Bacteroides*). Algunas bacterias (como *Propionobacterium* spp), la adquiere por mutaciones del ARN-ribosomal. Excepcionalmente, algunas bacterias anaerobias podrían inactivarlas por medio de enzimas. La adquisición puede ser por elementos móviles de resistencia. Se conocen muchos genes de resistencia a tetraciclinas, y gran parte de ellos se asocia a plásmidos, transposones e integrones. En los integrones se suele encontrar con otros genes de resistencia a otros antibióticos por lo que las cepas MDR pueden ser seleccionadas por las tetraciclinas u otros antibióticos. En general la resistencia es cruzada para todas las tetraciclinas. ^[19, 27]

Fluoroquinolonas: Las fluoroquinolonas interactúan con la ADN-girasa (o topoisomerasa-II) y la topoisomerasa IV, que son las enzimas que regulan los cambios conformacionales del cromosoma bacteriano durante la replicación y transcripción. Esta interacción inhibe completamente la actividad enzimática y provocan la fragmentación del ADN (impide a la célula bacteriana producir las proteínas necesarias para su reparación, crecimiento y reproducción) y generalmente, la muerte de la bacteria (bactericidas de amplio espectro). La resistencia se produce por una serie de **mutaciones consecutivas** en algunas regiones específicas (Quinolone Resistant determinig Regions o QRDRs), de las subunidades de la ADN-girasa (*gyrA* y *gyrB*) y del ADN de la topoisomerasa IV (*parC*). La acumulación de puntos de mutación, va reduciendo la Mínima dosis inhibidora (MIC). También pueden adquirir resistencia de baja intensidad por **cambios en las**

porinas de la membrana o por **regulación de las bombas de eflujo**, dando lugar a una menor permeabilidad de la membrana, pero una mayor capacidad de eflujo. Se han identificado varios **mecanismos mediadores de la resistencia** que incluyen las proteína Qnr que protegen el ADN de las topoisomerasas a las que se unen las quinolonas; la enzima AAC(6')-ib-cr que inactiva algunas fluoroquinolonas por acetilación y las bombas de eflujo QepA y OqxAB, que reducen la concentración de las quinolonas hidrofílicas. Estos mecanismos son importantes porque son transferibles por su frecuente asociación con las enzimas CTX-M y CMY que inactivan a las 3GC. Además se cree que pueden facilitar la resistencia por mutaciones cromosómicas. ^[19, 26]

Aminoglucósidos: son bactericidas (sobre todo frente a Gram negativos aerobios, incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. y algunos organismos no fermentadores nosocomiales; menor frente a bacterias Gram positivas como algunas cepas de *Staphylococcus*), se unen de forma irreversible a uno o más receptores de proteínas de la subunidad 30S del ribosoma de la bacteria interfiriendo varios mecanismos del proceso de traslación del ARNm. Son muy tóxicos, por eso se usan para administración tópica, o bien en prescripciones particulares específicas. Se absorben bien por vía IM, SC o IV, no por vía oral. Se excretan rápidamente por orina en forma de compuestos activos, pero son muy tóxicos (ototoxicidad, nefrotoxicidad), la administración tópica en herida abierta también puede producir toxicidad.

Numerosas bacterias Gram negativas (enterobacterias, *Pseudomonas*...), y Gram positivas (estafilococos y enterococos) contienen genes de resistencia vehiculados por plásmidos que codifican enzimas que catalizan la modificación de los aminoglucósidos por fosforilación, acetilación o adenilación. También algunos genes extracromosómicos confieren resistencia a aminoglucósidos, por metilación en la porción específica 16S del ARNr. ^[19] Así mismo, la alteración de la permeabilidad de la membrana y/o mutaciones cromosómicas. Las bacterias anaerobias son resistentes de modo natural por carecer de sistemas de transporte para captar a los aminoglucósidos.

Inhibidores de la ruta del ácido fólico:

Las Sulfamidas Inhiben la síntesis del ácido fólico, son bacteriostáticas, pero cuando se combinan (sulfamidas potenciadas), pasan a ser bactericidas y aumentan su espectro de acción. Su mecanismo es la inhibición de los ácidos nucleicos bacterianos. La resistencia a una de ellas da resistencia cruzada al resto. Actúa sinérgicamente con algunos derivados de las diaminopiridinas (comparten el modo de acción), tales como el trimethoprim y la pirimetamina. El SxT (Clotrimoxazol, en la proporción 1/5), es el más usado, ya no se suelen usar las sulfamidas solas. Su acción se inactiva en presencia de tejidos necróticos o secreciones purulentas. La resistencia bacteriana a las sulfamidas es por disminución de la permeabilidad de la membrana, expulsión activa (eflujo) o alteraciones enzimáticas que por una vía alternativa o por hiperproducción permiten la síntesis del ácido fólico. Se han encontrado *E. coli* que contienen genes capaces de sintetizar una nueva hidrofolato-reductasa (que es la que inhibe el trimethoprim), que es 10.000 veces menos susceptible al Trimethoprim (*in vitro*). La resistencia unas veces es debida a mutaciones y otras, a la

adquisición de plásmidos u otros elementos genéticos móviles que pueden portar genes de resistencia a otros antibióticos que favorece la selección de microorganismos multirresistentes, como ya se ha comentado anteriormente. Las bacterias anaerobias son resistentes de modo natural por carecer de sistemas de transporte para captar a los aminoglucósidos. [1, 19, 27]

3. **OBJETIVOS**

- **Objetivo principal:** analizar la evolución temporal y las características de la resistencia a los antibióticos de *E. coli* aislados de casos clínicos de carácter infeccioso en perros y gatos.
- **Objetivos secundarios:**
 - Analizar el estado de resistencia de *E. coli* en la clínica de perros y gatos en casos de infecciones genitourinarias.
 - Estudio de los factores que facilitan o predisponen al desarrollo de antibiorresistencia.
 - Analizar la repercusión de las recomendaciones sobre el control en la prescripción de antibióticos sobre la resistencia de *E. coli*.
 - Estudiar los resultados en relación a la salud humana y animal.

4. **MATERIAL Y MÉTODOS.**

4.1 Tipo de estudio: Se trata de un estudio retrospectivo que incluye casos de diagnóstico de infecciones de perro y gato recibidos en los años 2015 y 2016, en los que se ha aislado *Escherichia coli* (*E. coli*).

4.2 Animales del estudio: se han reunido los resultados de 52 animales de las especies canina y felina a partir de los casos que se derivan del Hospital Veterinario para el análisis de diversas infecciones a la Unidad de Enfermedades Infecciosas y Epidemiología.

4.3 Factores considerados en el estudio: hemos introducido en una base de datos (Excel, 2010), todos los factores que se conocían de los animales de los que se aisló *E. coli*:

- **Factores intrínsecos** al animal: **Sexo** (Macho y Hembra). **Edad:** Adulto (Cachorro, hasta 12m; Joven, de 12 a 24 m; Adulto, desde 24m a 8 años; Senior, mayor de 8 años). **Raza:** por la **pureza** (Pura, cuando la raza se diferencia claramente; Mestizo (Común en los gatos), cuando es un cruce de razas), y **Tamaño** del animal (Pequeña, hasta 15 K; Mediana de 16 a 30 K; y Grande > de 30 K).
- **Factores extrínsecos** al animal: Época del año: **Año** de estudio (2015, 2016). **Estación** del año. **Mes** del año.
- **Estado clínico** (leve, moderado, grave). **Evolución** clínica (aguda, crónica). Tipo de **cuadro clínico** (genital, urinario). **Tipo de muestra:** (útero, vagina, prepucio, orina). **Origen de la muestra** (interna, no tiene contacto con el exterior) y Externa (mucosas cercanas o en contacto con el exterior). Si ha habido **recidiva**. Si hubo **tratamiento antibiótico previo**.

4.4 Colección de las muestras: las muestras se recogieron con **hisopo estéril** en medio de transporte (Amiesmedium and swab PS + Viscose, Rf, 300287, Deltalab) para útero, vagina y prepucio, o **jeringuilla estéril** para la orina (cistocentesis). Estas muestras se remitían rápidamente al laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza

4.5 Aislamiento e identificación bacteriana

Todas las muestras se siembran en Agar Sangre de cordero permite aislar la mayoría de bacterias no fastidiosas (Columbia Agar base + 5% sangre de cordero desfibrinada- OXOID-Rf: PB5039A) y Agar MacConkey para enterobacterias (OXOID- Rf: PO0149). Tras el cultivo a 35-37°C durante 24-72 horas, las colonias sospechosas de ser *E. coli*, por su aspecto macroscópico, son observadas mediante tinción Gram para comprobar la morfología y coloración a nivel microscópico.

Cuando los pasos previos confirman que puede ser *E. coli*, se procede a realizar pruebas bioquímicas:

Catalasa (debe ser negativa); **Oxidasa** (debe ser positiva); **Ureasa** (debe ser positiva); **Indol** (debe ser positiva). **Cultivo en Agar-hierro-triple azúcar** (OXOID Rf: Rf. CM0277); **Fermentación de azúcares** mediante una batería de azúcares, con kits rápidos (**API® 20E**, Tf: 20100).

4.6 Test de Kirby-Bauer (Difusión en disco), para la determinación de la susceptibilidad a antibióticos:

Siguiendo las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standard Institut (CLSI) ^[4] se utiliza el medio de Agar Müller-Hinton (OXOID, Rf: CM0337), en placa de Petri de 90 mm. Con el hisopo se recogen unas colonias del cultivo y se diluyen en solución salina estéril hasta la concentración 0,5 de McFarland. A partir de esta dilución, con el mismo hisopo, se realiza la siembra de la bacteria en el medio, mediante estrías muy próximas que recorren toda la superficie del Agar en 3 direcciones. A continuación, se depositan asépticamente los discos de los antibiogramas elegidos, con una distancia que permita, al menos que no se mezclen los antibióticos durante la difusión. Se incuban a 35°C-37°C durante 18 a 24 h. La lectura se realiza, midiendo el halo de inhibición del crecimiento, teniendo como límites la zona en la que el crecimiento es mayor al 10% de la densidad del cultivo sin antibiótico.

Antibióticos usados:

- **Penicilinas:** Ampicilina (**AMP**); Amoxicilina-clavulánico (**AMC**).
- **Cefalosporinas:** Cefalexina (**CFL**), de **1GC** y Cefovecine (**CFV**), de **3GC**.
- **Aminoglucósidos:** Gentamicina (**GEN**).
- **Inhibidores de la vía del ácido fólico:** Trimethoprim-sulphamethoxazol (**SxT**)
- **Quinolonas:** Enrofloxacina (**ENR**), Pradofloxacina (**PRD**).
- **Tetraciclinas:** Doxiciclina (**DX**)

4.7 Análisis estadístico de los datos

Se trata de un estudio retrospectivo (2015 y 2016), de los patrones de resistencia de *E. coli* aislado de casos clínicos de infecciones genito-urinarias recibidos en el Hospital Veterinario de la Universidad de Zaragoza.

Análisis estadístico: se trabajó con Excel 2010 y el paquete estadístico EpiInfo™ 7.0 (Center for the Diseases Control and Prevention, Atlanta GA, USA), con el que se ha realizado el análisis de frecuencias y se ha determinado la asociación entre factores recogidos en el estudio y la resistencia a los antibióticos más utilizados mediante el test de contingencia chi-cuadrado o el test de Fisher (cuando alguna de las variables de los factores del estudio tiene un número comprendido entre 1 y 5 en alguna celda de la tabla de contingencia). Los valores de $p \leq 0,05$ al 95% de Intervalo de Confianza (IC) se consideran como asociación estadísticamente significativa.

5. RESULTADOS y DISCUSIÓN

5.1 Análisis de la resistencia a antibióticos en los aislados de *E. coli*, independiente del año de estudio

En general, se puede observar que los valores de resistencia encontrados en este estudio son altos (tabla 1), oscilando desde el 22%, en los aislados de origen felino en relación con ENR y PRD a los muy elevados encontrados en el gato (75%) y en el perro (93%) en relación a la DX. Se aprecia que los porcentajes son ligeramente inferiores en los aislados de gato, excepto para CFV y SxT, pero no son diferencias estadísticamente significativas.

En el estudio multicéntrico, ^[20] realizado con aislados de animales de compañía con infección urinaria procedentes de 14 países europeos, la resistencia a los antibióticos encontrada, era superior en los países del sur, respecto a los del norte y se consideraba que, probablemente, se debe a que en estos últimos, las medidas de control de la prescripción y administración de antibióticos se inició antes. En general, los altos valores de resistencia se relacionan con el uso abusivo de antibióticos, y es conocido que España es el país de la UE que más antibióticos consume en el ámbito veterinario. ^[8]

Tabla 1: Porcentaje de aislados *E. coli* resistentes a los antibióticos analizados en las los perros y gatos del estudio

Especie /R-Abco	Variables (N)	R n(%)	Especie / R-Abco	Variables (N)	R n(%)
AMC (53,01%; 26/49)	Felina (9)	4 (44,44)	ENR (32,65%; 16/49)	Felina (9)	2 (22,22)
	Canina (40)	22 (55,00)		Canina (40)	14 (35,00)
AMP (78,57%; 22/28)	Felina (4)	2 (50,00)	PRD (29,17%; 14/48)	Felina (9)	2 (22,22)
	Canina (24)	20 (83,33)		Canina (39)	12 (30,77)
CFV (38,78%; 18/49)	Felina (9)	4 (44,44)	GEN (46,81%; 22/47)	Felina (9)	4 (44,44)
	Canina (40)	15 (37,50)		Canina (38)	18 (47,37)
DX (89,58%; 43/48)	Felina (8)	6 (75,00)	SxT (29,17%; 14/48)	Felina (9)	4 (44,44)
	Canina (40)	37 (92,50)		Canina (39)	10 (25,64)

R-Abco.: Resistencia global a cada antibiótico; **R:** resistente

En el estudio realizado en Australia^[28], con aislados de *E. coli* procedentes de infecciones en perro, gato y caballo, usando la Mínima Concentración Inhibitoria (**MIC**) para interpretar la susceptibilidad a los antibióticos, en los *E. coli* de origen canino se encontraban porcentajes elevados de resistencia a CEF (Cefalotin), AMC y AMP, (95%, 46% y 44%, respectivamente), cuando utilizaban los puntos de corte promovidos por el CLSI para aislados de origen animal. En los *E. coli* de origen felino, encontraban un 100% de aislados resistentes a estos antibióticos (con los dinteles veterinarios). En la Unidad de Enfermedades Infecciosas, se utiliza habitualmente, el método de difusión en disco para la interpretación de la susceptibilidad a los antibióticos, y los puntos de corte usados son los recomendados por el CLSI^[4] para enterobacterias, en general. Son diferentes métodos, pero también hemos obtenido alta prevalencia de resistencia.

No se ha observado influencia sobre la resistencia de *E. coli* a los antibióticos incluidos en el estudio en relación con la especie animal, el sexo, (excepto para la AMC), edad (salvo ligera influencia en la de SxT), pureza de la raza, tamaño de la raza (salvo para AMC y CFV), el año de estudio (salvo para AMC), la estación del año (excepto para PRD y algo a AMC y ENR), el mes (salvo para AMC), el estado clínico (salvo algo para CFV, SxT), la evolución clínica, el tipo de cuadro clínico, el origen de la muestra, el tratamiento antibiótico previo (salvo para PRD y algo para ENR).

Moyaerty col. (2013)^[24] en el estudio de la resistencia (medida por MIC), de diferentes bacterias obtenidas de casos de UTI e infección prostática de perros y gatos, el 50% de los aislados eran *E. coli* (49% de perros y 67% de gatos). En general, el porcentaje de resistentes a los antibióticos era inferior a 7%, excepto para AMP (20%). Es probable que las diferencias con los resultados obtenidos por nosotros, se deban a la técnica utilizada. Es conocida la disparidad de resultados según métodos y laboratorios. También es probable que las poblaciones estudiadas estuvieran sometidas a diferente presión de RA.

La prevalencia global de resistencia a la **AMC** (53%), encontrada en este estudio, es un valor aproximado al detectado en el estudio realizado en Australia^[28] y en EEUU^[32], utilizando los puntos de corte veterinarios para la MIC. Según se indica en el Informe ESVAC^[8], las Penicilinas orales, (que son las más frecuentemente utilizadas en medicina de animales de compañía), suponen más de un 30% del total de penicilinas consumidas en España, para uso veterinario. El ácido clavulánico se combina con los Betalactámicos para aumentar su espectro bacteriano y la resistencia a las Betalactamasas^[19], por esta razón, y por tener efectos secundarios leves, generalmente, es uno de los más utilizados en las infecciones caninas y felinas, de forma empírica, y en consecuencia, uno de los más expuestos a perder efectividad.

No se ha observado influencia del **sexo** del animal en relación con la resistencia a AMP, CFL, CFV, DX, GEN, ENR, PRD, SxT, únicamente se ha detectado (tabla 2), respecto a la resistencia a **AMC** ($p=0,0323$), en los machos la prevalencia de aislados resistentes (68,18%), era muy superior a la de las hembras (40,70%). En otros estudios, se ha comentado que la porción proximal de la uretra y la vagina de las hembras les

predispone a infectarse por *E. coli* de origen fecal que, a su vez, se les considera más resistentes a los antibióticos, y una mayoría de artículos consultados parecen detectar mayor predisposición en las hembras [6, 10, 16, 22, 31] que sería lo contrario a lo detectado en este estudio. Sin embargo, en el estudio de Thungrat et al (2015) [32], la resistencia a la AMC mostrada por los *E. coli* aislados de los machos (60%), era superior a la de los aislados de las hembras (43%), que son muy parecidos a los encontrados por nosotros, si bien se refieren a *E. coli* aislados de cualquier tipo de infección, aunque predominaban los *E. coli* de infección urinaria. También hay algunos estudios que no relacionan el sexo del animal con la resistencia de los aislados de UTIs a los antibióticos [3, 22].

Tabla 2: Resultados del análisis estadístico entre factores intrínsecos del animal (sexo) y la resistencia de los antibióticos.

SEXO / Abco.	Variables (N)	R n(%)	S n(%)	Valor "p"
AMC	Hembra (27)	11 (40,74)	16 (59,26)	0,0323
	Macho (22)	15 (68,18)	7 (31,82)	

Abco.: antibiótico; **R:** resistentes; **S:** sensibles

No se ha observado influencia de la **edad** del animal en relación con la resistencia a AMC, AMP, CFL, CFV, DX, GEN, ENR y PRD, únicamente se ha detectado una ligera tendencia a la asociación respecto a la resistencia a **SxT** ($p=0,0692$), de modo que en los senior hubo menos aislados resistentes (16,1%), que en el resto de grupos de edad (tabla 3). Hay que señalar que los *E. coli* del cachorro de 4 meses y los 3 perros de 1 año, también eran resistentes a SxT, y la media de edad de los adultos era 5,3 años (intervalo de 2 a 8 años de edad). Este resultado es diferente a lo esperado y a lo observado por otros autores que indican que a mayor edad se aumentan los niveles de resistencia a los antibióticos. Así, en el estudio realizado por Dorsh y col (2015) [6] en casos de UTI felinas, se encontraba que eran más prevalentes en las hembras mayor edad. Thungrat y col (2015) [32], encontraron que los *E. coli* aislados de los gatos y perros geriátricos, tenían mayor riesgo de desarrollar resistencia a los antibióticos.

Tabla 3: Resultados del análisis estadístico entre factores intrínsecos del animal (edad) y la resistencia de los antibióticos.

Edad / Abco.	Variables (N)	R n(%)	S n(%)	Valor "p"
SxT	Adulto (13)	5 (38,5)	8 (61,5)	P: 0,0692
	Senior (32)	5 (16,1)	27 (83,9)	
	Cachorro + joven (4)	4 (100)	0 (0,0%)	NV

Abco.: antibiótico; **NV:** análisis no válido; **R:** resistentes; **S:** sensibles

El **tamaño del animal** se ha analizado solo en los perros, ya que la diferencia de tamaño de las razas de gatos no es reseñable. Por otro lado, solo hubo 3 aislados *E. coli* de las razas grandes y el análisis no es válido. No se ha observado influencia del tamaño del perro (mediana y pequeña) en relación con la resistencia a AMP, CFL, DX, ENR, GEN, PRD y SxT. En la tabla 4 se observa que la diferencia de la proporción de aislados resistentes a **AMC** de las razas medianas (72,7%), es superior a la de las pequeñas y grandes (ambas 33,3%), y la diferencia es estadísticamente significativa (P: 0,0118). Algo similar se observa en relación a la resistencia de *E. coli* a **CFV** (en razas pequeñas el 20% y en razas medianas el 54,6%), y en general la proporción de aislados resistentes de las raza pequeñas ha sido inferior al de las medianas salvo para GEN y SxT, en los que se invierte (no estadísticamente significativa).

Tabla 4: Resultados del análisis estadístico entre factores intrínsecos del animal (tamaño del animal) y la resistencia de los antibióticos.

Tamaño del animal / A.	Variables (N)	R n(%)	S n(%)	Valor "p" del factor	Asociaciones Valor "p"
AMC	Mediana (22)	16 (72,7)	6 (27,3)	P: 0,0438	Med. Vs Pq P: 0,0118
	Pequeña (15)	5 (33,3)	10 (66,7)		
	Grande (3)	1 (33,3)	2 (66,7)		
CFV	Mediana (22)	12(54,6)	10 (45,4)	NV	Med. Vs Pq F: 0,0375
	Pequeña (15)	3 (20,0)	12 (80,0)		
	Grande (3)	0 (0,0)	3 (100,0)		

Abco.: antibiótico; **Med.:** mediana; **NV:** análisis no válido; **Pq:** pequeña; **R:** resistente; **S:** sensible

No se encuentran estudios que relacionen el tamaño de la raza con la resistencia a los antibióticos. Thompson y col. (2011) ^[31] en su estudio sobre la resistencia a antibióticos de los *E. coli* aislados de casos de UTIs persistentes y recidivantes, comentan que los listados de razas predispuestas publicados en algunos artículos, más parecen ser consecuencia de las “modas” o popularidad de algunas razas. Si bien es verdad, que la mayoría de las razas a las que hacen referencia estos listados son de tamaño mediano y grande.

La **pureza de la raza** (considerando en conjunto los gatos y los perros), no parece haber influido en el aislamiento de *E. coli* resistentes a los antibióticos estudiados.

En los aislados de *E. coli* de gatos con UTI, hay poca información, aunque Dorsch y col, (2015) ^[6], comentan los estudios sobre predisposición a padecer UTI complicada y, mientras que algún estudio hablaba de la raza Abisinia como más predispuesta, ello mismo encuentra a los gatos Persa más predispuestos a padecerlas, si bien, atribuyen esta situación a que las UTI complicadas de los gatos de su estudio tienen como base otras enfermedades sistémicas, y en consecuencia los gatos Persa dejan de acicalarse y los largos pelos de la zona

perianal se ensucian con los restos de heces que favorecería el desarrollo de la UTI, y ya se ha comentado anteriormente el riesgo de que las infecciones de *E. coli* de origen fecal, puede relacionarse con mayor prevalencia de resistencia a antibióticos [5, 22].

No se ha observado influencia del **año** en el que el animal fue muestreado en relación con la resistencia a AMP, CFL, CFV, DX, GEN, ENR, PRD, SxT, únicamente se ha detectado (tabla 5) una tendencia a la significancia estadística en relación con la resistencia a **AMC** (F= 0,0019), de modo que en el año 2015 hubo más aislados resistentes (80,00%), que en 2016 (34,48%). Es algo similar a lo ocurrido con **AMP** (100%; 8/8), pero la ausencia de aislados sensibles invalida el análisis.

Tabla 5: Resultados del análisis estadístico entre factores extrínsecos (año) y la resistencia de los antibióticos.

AÑO/Abco.	Variables (N)	R n(%)	S n(%)	Valor "p"
AMC (49)	2015 (20)	16 (80,00)	4 (20,00)	F: 0,0019
	2016 (29)	10 (34,5)	19 (65,5)	

Abco.: antibiótico; **R:** resistentes; **S:** sensibles

Como se ha comentado anteriormente, España es el país de la UE que más antibióticos consume para uso veterinario [8], y es posible que una parte de los que se administran por vía oral, se refieran al consumo de los animales de compañía (sería inferior al 30% pero no se puede concretar). La mayor parte de los antibióticos son del grupo de las Penicilinas, seguido por las cefalosporinas 1GC y 2GC, los macrólidos, las fluoroquinolonas, las tetraciclinas y las lincosaminas. Además dentro del grupo de las penicilinas, la mayoría sería AMC, que explicaría los altos porcentajes de resistencia a este antibiótico encontrados en este trabajo. También se informa que el consumo global de antibióticos en España descendió ligeramente de 2014 a 2015, y que responde a un plan de acción de reducción del consumo de antibióticos veterinarios. Quizás esto podría explicar la tendencia observada en nuestro estudio, con el descenso del porcentaje de *E. coli* resistentes a AMC del 2015 al 2016, tendencia que también se observó en el resto de los antibióticos salvo para la ENR, PRD y SxT, en los que aumentaba ligeramente (diferencias no significativas).

En general, no se ha observado influencia de la **estación** del año en la que se aislaron los *E. coli*, si bien se observa que había mayor proporción de *E. coli* resistentes a **AMC** (tabla 6) en los aislados de la **primavera** que en los aislados del Invierno. Mientras que en relación con la resistencia a **ENR**, había mayor proporción de *E. coli* resistentes a ENR en los aislados del **Otoño** (50,0%), que en los de la Primavera (22,2%). Esta situación se repite en relación con la resistencia de *E. coli* a **PRD**.

Tabla 6: Resultados del análisis estadístico entre factores extrínsecos del animal (estación del año de muestreo) y la resistencia a los antibióticos.

Estación / Abco	Variables (N)	R n(%)	S n(%)	Valor factor "p"	Asociaciones
AMC	Invierno (10)	3 (30,0)	7 (70,0)	NS	I vs P F: 0,0706 Resto NS
	Primavera (18)	12 (66,7)	6 (33,3)		
	Otoño (14)	8 (57,1)	6 (42,9)		
	Verano (7)	3 (42,9)	4 (57,1)		
ENR	Invierno (10)	3 (30,0)	7 (70,0)	NS	O vs P F: 0,0622 Resto NS
	Primavera (18)	4 (22,2)	14 (77,8)		
	Otoño (14)	7 (50,0)	7 (50,0)		
	Verano (7)	2 (28,6)	5 (71,4)		
PRD	Invierno (10)	2 (20,0)	8 (80,0)	NS	O vs P F: 0,0363 Resto NS
	Primavera (18)	3 (16,7)	15 (83,3)		
	Otoño (13)	4 (30,8)	9 (69,2)		
	Verano (7)	2 (28,6)	5 (71,4)		

Abco.: antibiótico; **NS:** no significativo; **R:** resistentes; **S:** sensibles.

Teniendo en consideración que en la mayoría de los **meses** en los que se aisló *E. coli* el número de aislados era bajo, el análisis estadístico no fue válido en la mayoría de ellos. En términos generales, para aquellos en los que se pudo analizar, no se detectaba relación del mes de aislamiento del *E. coli* con la resistencia a AMP, CFL, CFV, DX, GEN, ENR, PRD, SxT, únicamente se ha detectado una ligera tendencia a la significancia estadística en relación con la resistencia a **AMC**, (tabla 7), de modo que la diferencia del porcentaje de aislados resistentes del mes de **Mayo** (88,89%) era claramente superior a la encontrada en el mes de Abril (25,00%) y el mes de Junio (42,9%). En los meses de Diciembre, Enero, Febrero, Marzo, Octubre y Septiembre el análisis no era válido.

No hemos encontrado información en la bibliografía revisada, que indique que la estación o el mes estén directamente relacionados con la resistencia observada. Únicamente hemos encontrado un estudio ^[14], que evaluaba la presencia de *Enterobacteriaceae* portadoras de BLEEs en las aguas residuales y su emisión en el medio ambiente en Polonia, y entre otros hallazgos observaron diferencias en la diseminación de las enterobacterias BLEEs en relación con la estación del año, que a su vez se relacionaba con la velocidad del viento y la temperatura ambiente (a mayor Tª y velocidad del viento, mayor frecuencia de estas bacterias). También es posible la interacción entre factores que pueden enmascarar los resultados.

Tabla 7: Resultados del análisis estadístico entre factores extrínsecos (mes), y la resistencia a antibióticos.

Mes / Abco	Variables (N)	R n(%)	S n(%)	Valor factor "p"	Asociaciones
AMC	Abril (4)	1 (25,00)	3 (75,00)	0,0877	Mayo vs Abril
	Julio (2)	1 (50,00)	1 (50,00)		F: 0,0527
	Junio (7)	3 (42,86)	4 (57,14)		Mayo vs Junio
	Mayo (9)	8 (88,89)	1 (11,11)		F 0,0769
	Noviembre (6)	5 (83,33)	1 (16,67)		Resto NS

Abco.: antibiótico; **NV:** no válido; **R:** resistentes; **S:** sensibles

El hecho de que el *E. coli* se haya aislado de **casos recidivantes** no se ha relacionado con la resistencia a AMP, CFL, DX y GEN. Por otro lado sí que se ha observado mayor porcentaje de resistencia (tabla 8), a **AMC** (75,0%), **CFV** (56,25%), **ENR** (50,00%), **PRD** (53,33%) y ligeramente superior en relación con **SxT** (43,8%), cuando se compara con los *E. coli* aislados de casos no recidivantes. En el caso de la resistencia a **AMP**, el análisis no es válido debido a que el 100% (8/8), de los *E. coli* aislados de casos recidivantes, eran resistentes. En los estudios de UTIs persistentes y recidivantes, suele ser difícil determinar si el agente aislado es el mismo que ocasionó el episodio anterior cuando son del mismo género y especie, y frecuentemente, en la clínica la única referencia que se tiene es la susceptibilidad del aislado a los antibióticos ^[31]. De este modo Seguin y col, (2003) ^[29], encontraba que un 42% de los segundos aislamientos de un agente, son recidivas o persistencia de la misma infección, en nuestro estudio es ligeramente inferior (34,7%). Estos aislados de *E. coli*, han mostrado resistencia a los antibióticos más usados en la clínica (tabla 8), que a su vez, favorecería la recidiva o la persistencia.

Tabla 8: Resultados del análisis estadístico de los factores clínicos (Recidiva) y la resistencia a antibióticos.

Recidiva / Abco	Variables (N)	R n(%)	S n(%)	Valor "p"
AMC	NO (33)	14 (42,42)	19 (57,58)	F 0,0328
	SI (16)	12 (75,00)	4 (25,00)	
CFV	NO (33)	10 (30,30)	23 (69,70)	0,0481
	SI (16)	9 (56,25)	7 (43,75)	
ENR	NO (33)	8 (24,24)	25 (75,76)	0,0443
	SI (16)	8 (50,00)	8 (50,00)	
PRD	NO (33)	6 (18,18)	27 (81,82)	0,0101
	SI (15)	8 (53,33)	7 (46,67)	
SxT	NO (32)	7 (21,88)	25 (78,13)	0,0695
	SI (16)	7 (43,75)	9 (56,25)	

Abco.: antibiótico; **R:** resistentes; **S:** sensibles

No se ha observado influencia del **estado clínico** del animal muestreado en relación con la resistencia a AMC, AMP, CFL, DX, ENR GEN y PRD. Por otro lado, los casos graves han dado lugar al aislamiento de mayor porcentaje de *E. coli* resistente (tabla 9), a **CFV** (75,00%), al compararlo con la resistencia de los aislados de casos leves (23,8%). Así mismo, la proporción de aislados resistentes a **SxT** de los casos graves (75,0%), era marcadamente superior, respecto a la de los casos moderados (20,8%).

En la mayor parte de las referencias revisadas, no se explicita la gravedad de los casos. En algunos se habla de casos complicados y no complicados. Dentro de los casos “no-complicados”(infección esporádica de la pared de la vejiga de la orina, en animales sanos, sin anomalías funcionales o anatómicas del tracto urinario) [33], se puede asumir que son “Leves”, mientras que los casos “complicados” (se presentan en concurrencia con otros procesos morbosos, anomalía anatómica o funcional del tracto urinario, que predisponen a la repetición (3 o más veces por año), se hagan persistentes y complicadas, y que se pueden relacionar con cálculos urinarios, diabetes mellitus, inmunosupresión, prostatitis, gestación y atonía neurogénica de la vejiga), pueden incluir a los moderados y graves [7, 33]. Las formas complicadas de UTI conllevan la repetición de tratamiento, el empleo de combinación de antibióticos o la administración por largos periodos de tiempo, que podría estar relacionado con lo observado en este estudio y su asociación con los niveles de resistencia encontrados en los casos graves.

Tabla 9: Resultados del análisis estadístico de los factores clínicos (Estado clínico) y la resistencia a antibióticos.

Estado Cl. / Abco	Variabes (N)	R n(%)	S n(%)	Valor "p" del factor	Asociaciones
CFV	Grave (4)	3 (75,00)	1 (25,00)	0,1045	Grave vs Leve F 0,0808
	Leve (21)	5 (23,81)	16 (76,19)		
	Moderado (24)	11 (45,83)	13 (54,17)		
SxT	Grave (4)	3 (75,00)	1 (25,00)	0,1057	Grave vs Moderado F 0,0581
	Leve (21)	6 (30,00)	14 (70,00)		
	Moderado (24)	5 (20,83)	19 (79,17)		

Abco.: antibiótico; **Estado Cl:** estado clínico; **R:** resistentes; **S:** sensibles

Por otro lado, se ha observado (tabla 10), que los animales que han **recibido tratamiento antibiótico previo**, dieron lugar a una proporción de *E. coli* resistentes a **ENR** y **PRD** (42,9% y 40,7% respectivamente), superior a los porcentajes encontrados en los aislados de animales que no lo recibieron (19,1% y 14,3% respectivamente).

Las FQs se recomienda reservarlas para su uso en casos graves o refractarios a otros antibióticos de primera línea [33]. Por otro lado, en el estudio multicéntrico europeo de resistencia en bacterias aisladas de UTIs de animales de compañía [20], los porcentajes de resistencia a estos antibióticos era de un 30%, y vemos en

nuestros resultados, que los aislados de *E. coli* de animales ya tratados con antibióticos lo superan ampliamente. Además, cuando una bacteria adquiere resistencia a una FQ, también lo expresa con el resto [26], lo que dificulta en el futuro el tratamiento de infecciones recurrentes y persistentes.

Tabla 10: Resultados del análisis estadístico de los factores clínicos (tratamiento antibiótico previo) y la resistencia a antibióticos.

Tto-Abco-Prev / Abco	Variables (N)	R n(%)	S n(%)	Valor "p"
ENR	NO (21)	4 (19,05)	17 (80,95)	F 0,0720
	SI (28)	12 (42,86)	16 (57,14)	
PRD	NO (21)	3 (14,29)	18 (85,71)	F 0,0444
	SI (28)	11 (40,74)	16 (59,26)	

Abco.: antibiótico; **R:** resistentes; **S:** sensibles; **Tto:** tratamiento

No se ha observado influencia de la **Evolución clínica** (aguda o crónica), o de si la muestra procedía de una caso de afección **genital o urinaria** del animal muestreado, o el **origen orgánico de la muestra** (orina, vagina, útero o prepucio), o si la **muestra tenía relación o no con el exterior**, en relación con la resistencia de los *E. coli* aislados a los antibióticos estudiados. Si bien, en algunas de las variables (muestras de útero y prepucio), el análisis no era válido por la escasez de datos.

En la tabla 11 se observa que al analizar la relación entre el número de géneros aislados con *E. coli*, desde la misma muestra (1 o >1 = solo o con otros géneros bacterianos), no se ha observado diferencia en la resistencia en la resistencia a AMC, CFL, CFV, ENR, GEN y PRD, mientras que llama la atención que cuando *E. coli* se aisló junto a otras bacterias, ha dado un 100% de resistentes a AMP y DX. Y en relación con SxT, la situación se invierte, mostrando un alto porcentaje de aislados sensibles (80,65%), cuando se aislaba *E. coli* en solitario. En el estudio de Martínez-Ruzfaet al (2014) [22], encontraban que un 77,4% de los casos de UTI felinas, se aislaba solo un agente microbiano y en el 50% de los casos se aislaba *E. coli*, y en el 57% de los casos de aislados múltiples, también se encontraba *E. coli*. Dorsch y col. (2015) [6], encontraban *E. coli* solo en el 45% de los casos y con otras bacterias en un 31%, no encontraban diferencias en el estado clínico del animal en relación al número de aislados en la muestra. No encontraban variación de la resistencia a lo largo del tiempo en *E. coli* aislados de formas recidivantes. Sin embargo, en las recomendaciones de uso de antibióticos en UTIs, SxT no se recomienda en casos en los que hay otras patologías subyacentes, debido a la posibilidad de causar trombocitopenia, y además en gatos, el sabor del producto oral es muy mal aceptado. Con todos los datos de que disponemos, no se explica que cuando *E. coli* es aislado en solitario sea altamente susceptible a SxT.

Tabla 11: Resultados del análisis estadístico del número de aislados de una muestra (1 o >1) y la resistencia a antibióticos.

Tto-Abco-Prev / Abco	Variables (N)	R n(%)	S n(%)	Valor "p"
SxT (48)	1 (31)	6 (19,35)	25 (80,65)	0,0285
	>1 (17)	8 (47,06)	9 (52,94)	
AMP (28)	1 (19)	13 (68,42)	6 (31,58)	NV
	>1 (9)	9 (100,00)	0 (0,00)	
DX (48)	1 (31)	3 (83,87)	18 (16,13)	NV
	>1 (17)	17 (100,00)	0 (0,00)	

Nota: "1" se refiere a *E. coli* sólo; >1 :*E. coli* + 1 o más bacterias de otros géneros

Del conjunto de los *E. coli* analizados, el 44,9% eran **MDR**, y el 46,9%, eran resistentes a menos de 3 grupos de antibióticos y un 8,2% fueron sensibles a todos los antibióticos utilizados. En la tabla 12, se observan los antibióticos más relacionados con la MDR. Por orden de importancia está relacionada con la resistencia a GEN, AMC, ENR, PRD y SxT, y algo con CFV. Probablemente, también se podría relacionar con la resistencia a AMP, pero en el grupo de los *E. coli*-MDR, todos los aislados eran resistentes y el análisis no es válido.

Esta situación, es alarmante. Una situación parecida se detectó en el estudio de Thungrat et al, (2015) ^[32], en EEUU, además estos autores también encontraron asociación con AMP, AMC, GEN y SxT, pero no con ENR. La escasa diferencia encontrada en la resistencia a AMC y AMP, al igual que lo que encontraron estos autores, apoya el uso de AMP como primera opción, en las infecciones por *E. coli* aislado de infección urinaria.

Tabla 12. Relación de la multiresistencia detectada en los *E. coli* aislados con los antibióticos analizados

MDR	AMC-R; n (%)	CFV-R; n (%)	ENR-R; n (%)	GEN-R; n (%)	PDR-R; n (%)	SxT-R; n (%)
NO	11/27 (44,74)	8/27 (29,63)	2/27 (7,41)	7/25 (28,00)	1/27 (3,7)	4/26 (15,38)
SÍ	15/22 (68,18)	11/22 (50,00)	14/22 (63,64)	15/22 (68,18)	13/21 (61,9)	10/22 (45,45)
	P = 0,0323	P = 0,0813	F = 0,0001	P = 0,0038	F = 0,0001	F = 0,0243

R: resistentes

El número de géneros bacterianos aislados de una muestra, la especie, edad, sexo, pureza y el tamaño de la raza, el estado y evolución clínica, el tipo de muestra analizado o si ésta procedía de órgano externo o interno no parecen haber influido en el aislamiento de *E. coli* MDR.

Además, en la tabla 13 se aprecia una posible relación con la estación del año, encontrándose el mayor porcentaje en otoño (73,3%), que era marcadamente superior al porcentaje encontrado en el invierno

(20,0%) y verano (28,6%). Por otro lado no se detectaban diferencias en el porcentaje de aislados MDR en relación con el año y el mes de muestreo, si bien cabe destacar que en Noviembre se obtuvo el mayor porcentaje (66,7%). La mayoría de los aislados *E. coli* MDR (76,5%), procedían de casos **recidivantes**. Asimismo parece que hay cierta diferencia en relación con el tipo de cuadro clínico del que procedían, siendo algo superior, en los procedentes de cuadro clínico **urinario** (52,6%) en comparación con el genital (25,0%). Asimismo se ha observado un mayor porcentaje, de aislados de *E. coli* MDR (58,6%), de los animales que habían sido **tratados con antibiótico previamente**, respecto a los que no habían sido tratados (28,6%).

Tabla 13: Resultados del análisis estadístico de los factores considerados en el estudio, en relación con la detección de cepas multiresistentes (MDR).

Factor	Variables (N)	MDR n(%)	NO MDR n(%)	SI	valor "p"	Asociaciones	Valor "p"
Estación	Invierno (10)	8 (80,00)	2 (20,00)		0,0419	O vs I	F 0,0127
	Otoño (15)	4 (26,67)	11 (73,33)			O vs V	F 0,0642
	Pimavera	10 (55,56)	8 (44,44)			Resto	NS
	Verano (7)	5 (71,43)	2 (28,57)				
Recidiva	NO (33)	23 (69,70)	10 (30,30)		F 0,0023		
	SI (18)	4 (23,53)	13 (76,47)				
C. clínico	Genital (12)	9 (75,00)	3 (25,00)		F 0,0886		
	Urinario (39)	18 (47,37)	20 (52,63)				
Tto. Abco previo	NO (22)	15 (71,43)	6 (28,57)		0,0208		
	SI (30)	12 (41,38)	17 (58,62)				

NS: No significativo; **Tto.Abco.:** tratamiento antibiótico; **C. Clínico:** cuadro clínico

En general se ha observado que el desarrollo de *E. coli* MDR, está aumentando en los animales de compañía ^[28], a pesar de los programas de vigilancia promovidos en países europeos ^[8]. En el estudio realizado en Australia ^[28], también encontraban diferencias significativas en la proporción de aislados MDR en relación con haber recibido tratamiento antibiótico previo, en relación con la edad (> de 10 años), y enfermedades concomitantes. Ellos no estudiaron la diferencia en cuanto al tipo de afección (genital o urinario), ni en relación a la estación del año. Pero no detectaban diferencias en relación con los casos recidivantes. Por otro lado, en el estudio de en EEUU ^[32], sí que encontraron que los perros eran más proclives que los gatos a padecer infecciones con *E. coli* MDR, así como en los animales geriátricos (entre 12,5 a 15 años), sin embargo, el porcentaje de *E. coli* MDR aislado de infección urinaria era inferior al detectado por nosotros (23,7%).

5.2 Análisis de la susceptibilidad a los antibióticos en el conjunto de los *E. coli* aislados en los años 2015 y 2016

En la tabla 14 se observan los porcentajes de aislados de *E. coli* resistentes a los antibióticos más usados en la clínica. El valor más elevado se ha observado en la DX (89,6%), CFL (81,3%) y AMP (78,6%). La menor prevalencia de resistentes se detectó en PRD y SxT (ambos 29,2%) y ENR (32,7%). Cabe destacar que la proporción de aislados MDR es elevada (44,9%) y que ha aumentado en 2016 (58,6%). Al comprobar la evolución de la resistencia entre los años 2015 y 2016, se ha observado un descenso notable en relación con AMC, AMP (más notable en AMP, pero el análisis no es válido), en el resto de los antibióticos, las proporciones son similares en ambos años, aunque destaca un ligero aumento en relación con SxT.

En un estudio retrospectivo de 10 años (2000 a 2009) ^[6], con bacterias aisladas de casos de UTI felinas (375 diferentes aislados), en la facultad de veterinaria de Munich (Alemania), en los que predominaron los *E. coli* (42,3%), únicamente se encontró impacto del factor tiempo sobre la Nitrofurantoina (muy poco utilizada en nuestro estudio), que incrementaba conforme pasaban los años, mientras que para DX, SxT, GEN, ENR, AMC, no se apreciaba un cambio de la prevalencia de aislados resistentes en relación al tiempo. Algo similar se observó en una mayoría de los países de la UE que participaron en el estudio multicéntrico ^[20], pero en algunos países, la resistencia de *E. coli* descendía, sin embargo, en Holanda aumentaba para AMC, y en Suiza para GEN. En Portugal había una ligera tendencia a aumentar, si bien se partía de valores muy bajos tanto para AMC como para cefalosporinas 3GCs, algo similar a lo observado en Alemania y Suiza, respecto a AMC. En cualquier caso, la prevalencia de resistencia era más elevada en países del sur de Europa. Los autores consideran que puede haber factores de confusión que alteran la interpretación de los resultados, ya que se admite que la mayoría de los casos que llegan a diagnosticarse son UTIs complicadas. El uso de diferentes métodos de detección de la resistencia y diferentes puntos de corte, también pueden ser motivo de diferencias entre los países. La armonización de los métodos entre países debe ser la base para conocer bien la evolución de la resistencia a lo largo del tiempo.

Por otro lado, el descenso en la resistencia observado para AMC y AMP y la estabilidad observada en relación a CFL, CFV, DX, ENR, GEN, PRD y SxT (éste con tendencia al aumento, pero no es significativo), podrían estar relacionados con las observaciones que se hacen en el informe de la ESVAC de 2010-2015 ^[8] que ya detectaban el descenso de consumo de antibióticos en España entre el año 2014 y 2015, eso unido a las campañas de concienciación sobre el uso y prescripción de los antibióticos veterinarios.

Tabla 14: Frecuencia de aislados *E. coli* resistentes a los antibióticos utilizados en el estudio (en conjunto y por año):

Antibiótico (%-R) (n/N)	Año (N)	n (%)	Valor "p"	Antibiótico (%-R) (n/N)	Año (N)	n (%)	Valor "p"
AMC (53,1%) (26/49)	2015 (20)	16 (80,0)	F 0,0019	ENR (32,7%)(16/49)	2015 (20)	6 (30,0)	NS
	2016 (29)	10 (34,5)			2016 (29)	10 (34,5)	
AMP (78,6%) (22/28)	2015 (8)	8 (100,0)	NV	GEN (46,8%)(22/47)	2015 (20)	10 (50,0)	NS
	2016 (20)	14 (70,0)			2016 (27)	12 (44,4)	
CFL (81,3%) (13/16)	2015 (13)	11 (84,6)	NS	PRD (29,2%)(14/48)	2015 (19)	5 (26,32)	NS
	2016 (3)	2 (66,7)			2016 (29)	9 (31,0)	
CFV (38,8%) (19/49)	2015 (20)	8 (40,0)	NS	SxT (29,2%)(14/48)	2015 (20)	4 (20,0)	NS
	2016 (29)	11 (37,9)			2016 (28)	10 (35,7)	
DX (89,6%) (43/48)	2015 (20)	19 (95,0)	NS	MDR (44,9%)(22/49)	2015 (20)	10 (50,0)	NS
	2016 (28)	24 (85,7)			2016 (29)	17 (58,6)	

%-R: porcentaje de *E. coli* resistentes; **NS**: no significativo; **NV**: no válido

5.3 Análisis de la evolución temporal de la susceptibilidad a antibióticos de los *E. coli* aislados en 2015 y 2016, en relación con los factores considerados en el estudio.

El análisis de los factores considerados en el estudio en relación con la resistencia a los antibióticos en los años 2015 y 2016, únicamente ha dado algunas diferencias en relación con la resistencia a **AMC** (tabla 15) y a la **MDR** (tabla 16). En la tabla 15 se observa que la tendencia observada en la población general (tabla 14), mostrando la disminución de la prevalencia de aislados resistentes entre 2015 y 2016, se mantienen en el conjunto de los resultados observados en relación a los factores estudiados. Si bien se debe considerar que ha habido una serie de análisis no válidos, debido a escasez de número de aislados (gatos, machos, raza mestiza, tamaño de la raza, estación o el mes de estudio, infección del aparato genital, muestras externas, casos recidivantes).

Se ha analizado el **nº de aislados** por muestras (1 o más de 1), en relación con la resistencia a los antibióticos, y el **año** de estudio. En la tabla 15 se observa que cuando *E. coli* se aisló en **solitario** (65,3% de los casos), el porcentaje de resistencia a **AMC** en los aislados del año **2015** eran muy elevado (91,7%) y significativamente superiores al del 2016 (30,0%). En la tabla 15 se observa que cuando se aisló *E. coli* únicamente, la proporción de aislados **MRD** (tabla 16), era superior en 2015 (58,3%) a la de 2016 (30,0%).

El resto de los datos que se presentan en la tabla 15 son aquellos en los que el análisis indicaba alguna tendencia a la significancia estadística, y se puede apreciar que de manera constante los valores de resistencia de los *E. coli* encontrados en 2015 son superiores a los de 2016, para todos las variables que han podido ser analizadas, en relación a **AMC**, ya que respecto al resto de los antibióticos y variables la

diferencia no mostraba diferencias significativas entre ambos años o no podía ser analizado por escasez de datos.

Tabla 15: Evolución temporal de la resistencia a AMC de los *E. coli* aislados en 2015 y 2016 en relación a los factores estudiados.

Factor: variable (N)	Año (N)	n (%)	Valor (p o F)
Nº de aislados: Uno (32/49; 65,3%)	2015 (12)	11 (91,7)	F 0,0008
	2016 (20)	6 (30,0)	
Especie: Perro (40)	2015 (17)	14 (82,4)	F 0,0033
	2016 (23)	8 (34,8)	
Sexo: Hembra (22)	2015 (17)	5 (83,3)	F 0,0265
	2016 (23)	6 (28,6)	
Raza: Pura (28)	2015 (14)	11 (78,6)	F 0,0070
	2016 (14)	3 (21,4)	
Estado Cl: Leve (21) Moderado (24)	2015 (8)	7 (87,5)	F 0,0375
	2016 (13)	5 (38,5)	
	2015 (12)	9 (75,0)	F 0,0498
	2016 (12)	4 (33,3)	
Evolución Cl: Crónica (29)	2015 (14)	12 (85,7)	F 0,0056
	2016 (15)	5 (33,3)	
Hisotrial: Urinario (38)	2015 (14)	13 (92,9)	F 0,0009
	2016 (24)	9 (37,5)	
Tipo Muestra: Interna (39)	2015 (14)	13 (92,9)	F 0,0006
	2016 (25)	9 (36,0)	
Tto. Antibiótico previo: SI (28)	2015 (14)	12 (85,7)	F 0,0009
	2016 (14)	3 (21,4)	

Cl: clínico; **Tto.:** tratamiento

Aunque solo se haya podido tener resultados señalables respecto a AMC, también es importante señalar que es uno de los antibióticos más utilizados en la clínica de perro y gato, de modo que el observar esa tendencia al descenso, es un dato que da cierta esperanza en el avance del control de la resistencia a antibióticos, como ya se apuntaba levemente, entre el año 2014 y 2015, respecto a los aislados de origen humano y animal, en España. ^[8, 20]

Tabla 16: Evolución temporal del porcentaje de *E. coli* MDR aislados en 2015 y 2016 en relación a los factores estudiados.

	Factor: variable (N)	Año (N)	n (%)	Valor “p”
MDR	Nº de aislados: Uno (32)	2015 (12)	7 (58,3)	P: 0,0696
		2016 (20)	6 (30,0)	

5.4 Relación de la resistencia cruzada de los *E.coli* aislados hacia los antibióticos usados en el estudio.

La mayoría de los análisis de la resistencia de los *E. coli* estudiados por parejas de antibióticos, no han mostrado diferencias estadísticamente significativas. Presentamos, los resultados con mayor interés para su aplicación en la clínica:

En relación con **AMC** y **AMP**, ninguno de los aislados resistentes a AMC, era sensible a AMP (como era de esperar), pero un 41% (9/22), de los resistentes a AMP, fueron sensibles a AMC.

Como es conocido, cuando se adquiere resistencia a AMP, también se adquiere para el resto de las penicilinas, sin embargo no a las que están unidas a los inhibidores de las β -lactamasas^[18, 19]. Este resultado indica que cuando falla AMP en el tratamiento de infección por *E. coli*, AMC es una buena alternativa, a nivel empírico.

Cuando se compara la resistencia a **AMC** y **CFV**, 11 de los aislados resistentes a AMC, eran sensibles a CFV (42,3%; 11/26), mientras que solo 4 de los resistentes a CFV, eran sensibles a AMC (21,1%; 4/19). Estas diferencias son estadísticamente significativas (F: 0,0042). Cuando *E. coli* adquiere resistencia a cefalosporinas 3GC y 4GC y a los monobactámicos, generalmente también pueden ser resistentes a los inhibidores de las β -lactamasa, como a AMC^[18, 19]. Esto se aprecia en los resultados que hemos obtenido, de modo que, cuando la AMC falla, el CFV podría ser una buena alternativa a nivel empírico

Así mismo, ninguno de los *E. coli* resistentes a **CFV** (que es una 3GC), fueron sensibles a **CFL** (lo que era de esperar por ser de 1GC), mientras que al contrario, 5 de los 11 *E. coli* resistentes a CFL, eran sensibles a CFV (45,5%; 5/11).

Como se ha comentado anteriormente, los mecanismos de resistencia a las cefalosporinas de 1GC, son menos complejos que los de las 3GC y, en general, éstas suelen perder su efectividad con menos frecuencia. Pero ya se ha comentado que las BLEE se están diseminando ampliamente^[8]. Así que, también se aprecia que si falla el tratamiento con CFL, el CFV puede ser una buena alternativa a nivel empírico.

Comparando la sensibilidad de *E. coli* a **ENR** y **PRD** ninguno de los aislados resistentes a PRD, eran sensibles a ENR, sin embargo, 2 de los *E. coli* resistentes a ENR, eran sensibles a PRD (12,5%; 2/16).

Cuando se compara la susceptibilidad de las QNs respecto a la de **CFV** (3GC), se observa que tanto para **ENR** como para **PRD**, el 50% de los aislados resistentes a ENR o a PRD, es sensible a CFV, mientras que solo el 33% de los resistentes a CFV es sensible a ENR, o el 35% respecto a PRD. Es decir que, aunque las diferencias

observadas no son estadísticamente significativas, parece que las quinolonas han tenido menor eficacia que la CFV frente a los *E. coli* de este estudio.

Los mecanismos mediadores de la resistencia a las quinolonas son importantes porque son transferibles y por su frecuente asociación con las enzimas CTX-M y CMY que inactivan a las 3GC. Además se cree que pueden facilitar la resistencia por mutaciones cromosómicas^[19, 26]. Es difícil discernir por estos resultados de qué modo se desarrolló la resistencia de estos aislados, únicamente se puede decir que los aislados que eran resistentes a FQs y CFV, en parte podían venir a través de plásmidos.

Ninguno de los *E. coli* resistentes a **ENR**, era sensible a **DX**, mientras que el 62,8% (27/43) de los resistentes a **DX**, era sensible a **ENR**. Ninguno de los *E. coli* resistentes a **PRD**, era sensible a **DX**, mientras que el 67,4% (29/43) de los resistentes a **DX**, era sensible a **PRD**.

La resistencia a **DX** está siendo muy llamativa en la mayoría de los países, llegando a encontrar niveles del 100% de aislados resistentes^[19, 27]. En el estudio a lo largo de 10 años de Dorsch et al., 2015^[6], no encontraba variación de la resistencia a lo largo de ese tiempo. En el informe ESVAC^[8], se indica que en España se consumen una elevada cantidad de doxiciclina, llegando al máximo en 2014, y disminuyendo en 2015 (1.016 toneladas de tetraciclinas para animales de abasto). Esto podría explicar los elevados niveles de resistencia encontrados por nosotros, por otro lado, vemos que las quinolonas son una buena alternativa cuando se observa resistencia al tratamiento con **DX**. Precisamente por ser los antibióticos que mejor resultado han dado a nivel clínico, son los que se deben preservar para cuando el resto de los antibióticos fallan.

El 42,9% (6/14) de los *E. coli* resistentes a **PRD**, eran sensibles a **SxT** y viceversa. Las diferencias en la sensibilidad de los *E. coli* estudiados a estos dos antibióticos es estadísticamente significativa ($p: 0,0064$).

Ambos tipos de antibióticos comparten modos de adquisición de la resistencia como los plásmidos, ambos inhiben a los ácidos nucleicos de la bacteria por diferentes vías^[19, 27]. En nuestros resultados parece que no ha sido esa la principal vía de adquisición de la resistencia, sino que podría tratarse de mutaciones, ya que la proporción de aislados resistentes **PRD** o **SxT** que a su vez son sensibles a **SxT** o **PRD**, respectivamente, son idénticas, y estas diferencias son estadísticamente significativas.

El 27,3% (6/22) de los *E. coli* resistentes a **GEN**, eran sensibles a **AMC**, mientras que el 36% (9/25) de los resistentes a **AMC**, eran sensibles a **GEN**. Las diferencias observadas son estadísticamente significativa ($p: 0,0073$), Estos resultados parecen indicar que la resistencia a **AMC** y **GEN** en estos aislados, tiene bases diferentes, es decir, que la resistencia a uno de ellos, no tiene relación directa con la del otro, pero en cualquier caso, según nuestros resultados, ha fallado más la **AMC** que **GEN** frente a los *E. coli* estudiados. Es fácil de comprender ya que la **GEN** apenas se usa en el tratamiento de infecciones genitourinarias, por sus efectos tóxicos, y además, su uso por vía parenteral reduce su administración a situaciones que requieren hospitalización.

6. CONCLUSIONES

- La prevalencia de resistencia de *E. coli* a los antibióticos es elevada y similar a la que se reconoce en los países del sur de Europa en los *E. coli* procedentes de infecciones animales.
- Se sugiere llevar un orden en la prescripción empírica de antibióticos orales, para infecciones genitourinarias: AMP, AMC, CFV, SxT, ENR, PRD.
- No hay diferencias notables en la resistencia encontrada en los aislados de perros y gatos, así como en relación al resto de sus características intrínsecas, en general.
- Se observa una débil tendencia a la disminución de la prevalencia de resistencia entre el año 2015 y 2016. Esto podría estar relacionado con una mayor concienciación de la importancia de realizar un uso comedido y apropiado de los antibióticos, pero indica que todavía se debe seguir profundizando en esta línea de trabajo.
- Se debería considerar que la estrecha convivencia entre las mascotas y sus dueños, puede facilitar la transmisión interespecífica de bacterias resistentes, así como elementos móviles de transmisión de la resistencia. Se debería incidir en la educación en medidas higiénico-sanitarias, en el ámbito familiar.

CONCLUSIONS

- The *E. coli* prevalence of resistance to antibiotics is high and similar to that recognized in the countries of southern Europe in the *E. coli* from human and animal infections.
- It is suggested to take an order on the empirical prescription of oral antibiotics, for genitourinary infections: AMP, AMC, CFV, SxT, ENR, PRD.
- There are no important differences in the resistance found in isolates from dogs and cats, as well as in relation to the rest of their intrinsic characteristics, in general.
- There has been observed a weak tendency to the decrease in the prevalence of resistance between the year 2015 and 2016. This could be related to a greater awareness of the importance of a restrained and appropriate antibiotic use, but it indicates that still it should further deepen in this line of work.
- It should be considered that narrow coexistence between pets and their owners, can facilitate interspecific transmission of resistant bacteria, as well as mobile elements of resistance transmission. It should stress in education on health and hygiene measures, also in the family.

7. VALORACIÓN PERSONAL

Este trabajo me ha servido, entre otras cosas, para aprender a buscar artículos y páginas de interés y sobre todo cómo sintetizar la información que busco y de interés. También me ha enseñado a saber interpretar y

expresar los resultados obtenidos de muestras analizadas en el laboratorio y a sacar conclusiones sobre dichos resultados.

Además, he podido estudiar más en detalle y ampliar mis conocimientos sobre un tema tan actual y de tanta importancia como es la resistencia a los antibióticos y sus repercusiones tanto en sanidad animal como en salud pública, siendo una de las causas principales de las resistencias a antibióticos el mal uso de éstos.

He tomado conciencia sobre el papel fundamental que desempeñan los veterinarios en este campo, que es, entre otros aspectos, la puesta en marcha de medidas y protocolos de actuación tanto para prevenir como para solucionar dicho problema.

Agradecimientos

A mi tutora de este trabajo, María del Carmen Simón Valencia, con quien he tenido la suerte de trabajar y aprender mucho sobre este trabajo y otros aspectos importantes relacionados y que me ha prestado la máxima atención y ayuda para poder llevarlo a cabo.

También quiero agradecer a Jesús Orós Espinosa, con quien he tenido el placer de realizar las prácticas de laboratorio y gracias a él he aprendido mucho y he estado muy a gusto.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Albarellos GA. and Landoni MF. Current concepts on the use of antimicrobials in cats. *The Veterinary Journal*. 2009, 180: 304-316
2. Bajaj P., Singh NS., Viridi JS. *Escherichia coli* β -Lactamases: What Really Matters. *Frontiers in Microbiology*. 2016, 7:417.
3. Carvalho VM., Spinola T., Tavolari F., Irino K., Oliveira RM. and Ramos MCC. Urinary tract infection (UTI) in dogs and cats: etiology and antimicrobial resistance. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 2014, 34 (1): 62-70

4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-fifth information supplement. M100-S25. 2015.
5. Costa D., Poeta P., Sáenz Y., Coelho AC., Matos M., Vinué L., Rodriguez J., Torres C. Prevalence of antimicrobial resistance and resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pets. *Veterinary Microbiology*. 2008, 127: 97–105
6. Dorsch R. von Vopelius-Feldt C., Wolf G., Straubinger RK. and Hartmann K. Feline urinary tract pathogens: prevalence of bacterial species and antimicrobial resistance over a 10-year period. *Veterinary Record*. 2015, 176 (8): 201
7. Dorsch R., von Vopelius-Feld C., Wolf G., Mueller, RS., Straubinger, RK., Hartmann K. Urinary tract infections in cats. Prevalence of comorbidities and bacterial species, and determination of antimicrobial susceptibility to commonly used antimicrobial agents. *Tieraerztliche praxis ausgabe kleintiere heimtiere*. 2016, 44 (4): 227-236

8. European Medicines Agency. Science Medicines Health (ESVAC). Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2015. Trends from 2010-2015. Seventh ESVAC report. 2015.
9. FAO-OIE-OMS. Alianza tripartita: una estrategia mundial intersectorial para «Una sola salud». Portal de la Resistencia a Antimicrobianos: <http://www.oie.int/es/para-los-periodistas/amr-es/press-releases-es>. 2017.
10. Graham E.M., Taylor D.J. Bacterial reproductive Pathogens of Cats and Dogs. *Veterinary Clinics. Of Small Animals*. 2012, 42: 561-582.
11. Greene, Craig E. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. St. Louis, Missouri: Elsevier. Fourth Edition. 2012.
12. Johnson JR., Clabots C. Sharing of virulent *Escherichia coli* clones among household members of a woman with acute cystitis. *Clinical Infectious Diseases*. 2006, 43: 101–108

13. Johnson, J.R., Clabots, C. Kuskowski, M.A. Multiple-host sharing, long-term persistence, and virulence of *Escherichia coli* clones from human and animal household members. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008, 46: 4078– 4082
 14. Korzeniewska E., Harnisz M. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive *Enterobacteriaceae* in municipal sewage and their emission to the environment. *Journal of Environment Management*. 2013, 128: 904-911
 15. Laxminarayan R., Matsoso P., Pant S., Brower C., Røttingen JA., Klugman K., Davies S. Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge. *Lancet*.2016, 387 (10014): 168-175
 16. Litster A., Thompson M., Moss S., Trott D. Feline bacterial urinary tract infections: An update on an evolving clinical problem. *The Veterinary Journal*.2011, 187: 18-22
 17. MacGowan AP., Macnaughtonn E. Antibiotic resistance. *Prevention and control of infection. Medicine*. 2017, 45 (10): 622-628
 18. Mammeri H. and Nordmann P. Extended-Spectrum Cephalosporinases in *Enterobacteriaceae*. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*. 2007, 6:71-82
 19. Mandell, Douglas and Bennett's. *Principles and Practice of Infectious diseases*. John E. Bennett, Raphael Dolin, Martin J. Blaser. Saunders, an imprint of Elsevier Inc. Eighth edition. 2015.
 20. Marques C., Gama LT., Belas A., Bergström K., Beurlet S., Briend-Marchal A., et al. European multicenter study on antimicrobial resistance in bacteria isolated from companion animal urinary tract infections. *BMC Veterinary Research*. 2016, 12: 213, 17
 21. Martínez JL. Environmental pollution by antibiotic resistance determinants. *Environmental pollution*.2009, 15 (11): 2893-2902
 22. Martinez-Ruzafa, Ivan, Kruger, John M., Miller, RoseAnn, Kaneene, John B., Swenson, Cheryl L., Bolin, Carole A. Clinical features and risk factors for development of urinary tract infections in cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2012, 14(10): 729-740
-
23. Miller K., O'Neill A.J., Chopra I. *Escherichia coli* mutators present an enhanced risk for emergence of antibiotic resistance during urinary tract infections. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2004, 48: 23– 29.
 24. Moyaert H., El Garch F., De Jong A., Klein U., Rigaut D., Stegemann M., Thomas V., Vallé M. Antimicrobial susceptibility monitoring of urinary tract and prostatic pathogens isolated from diseased dogs and cats across Europe. *ComPathl*.2008-2010: 23rd ECVIM-CA congress Liverpool– UK, Septembre 2013
 25. Nhung NT., Cuong NV., Campbell J., Hoa, N. T. Bryant, J. E. Truc., V. N. T., et al. High Levels of Antimicrobial Resistance among *Escherichia coli* Isolates from Livestock Farms and Synanthropic Rats

- and Shrews in the Mekong Delta of Vietnam. Elkins CA., ed. Applied and Environmental Microbiology.2015, 81(3): 812-820
26. Redgrave LS., Sutton SB., Webber MA., and Piddock LJV. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. Trends Microbiology. 2014, 22 (8): 438-445.
 27. Roberts MC. Resistance to tetracycline, macrolide-lincosamide-streptogramin, trimethoprim, and sulfonamide drug classes. Molecular Biotechnology.2002, 20: 261-83
 28. Saputra S., Jordan D., Mitchell T., Wong HS., Abrahama RJ., Kidsley A., Turnidge J., Trotta DJ. and Abraham S. Antimicrobial resistance in clinical Escherichia coli isolated from companion animals in Australia. Veterinay Microbiology. 2017, 211: 43-50
 29. Seguin, M.A., Vaden, S.L., Altier, C., Stone, E., Levine, J.F. Persistent urinary tract infections and reinfections in 100 dogs (1989–1999). Journal of VeterinaryInternal Medicine.2003, 17: 622–631
 30. Suarez C. y Gudiol F. Antibióticos Betalactámicos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2009, 27 (2): 116-129
 31. Thompson MF., Litster AL., Platell JL. andTrott DJ. Canine bacterial urinary tract infections: New developments in old pathogens. The Veterinary Journal.2011, 190: 22–27
 32. Thungrat K., Price SB., Carpenter DM. and Boothe AM. Antimicrobial susceptibility of clinical Escherichia coli isolates from dogs and cats in the United States.January 2008 through January 2013. Veterinary Microbiology.2015,179: 287-295
 33. Weese, J.S., Blondeau, J.M., Boothe, D., Breitschwerdt, E.B., Guardabassi, L., Hillier, A., Lloyd, D.H., Papich, M.G., Rankin, S.C., Turnidge, J.D.,et al. Antimicrobial use guidelines for treatment of urinary tract disease in dogs and cats: Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases. Veterinay Medicine International.2011, Article ID 263768, 9 p <http://dx.doi.org/10.4061/2011/263768>
 34. Wong C., Epstein SE., and Westropp JL.Antimicrobial Susceptibility Patterns in Urinary Tract Infections in Dogs(2010-2013). Journal of Veterinary International Medicine.2015, 29:1045–1052